

Entwicklung und Charakterisierung neuartiger Markierungen für Biomoleküle mit Anwendungen in NMR-Hyperpolarisationstechniken



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

**Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Dissertation

von

Kevin Sebastian Herr

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerd Buntkowsky

Zweitgutachter: Prof. Dr. Harald Kolmar

Darmstadt 2021

Tag der Einreichung:

13. Juli 2021

Tag der mündlichen Prüfung:

30. September 2021

Herr, Kevin Sebastian:

Entwicklung und Charakterisierung neuartiger Markierungen für Biomoleküle mit
Anwendungen in NMR-Hyperpolarisationstechniken
Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2021-10-04

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-197015

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2021

Veröffentlichung unter CC BY-NC-ND 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>



Die vorliegende Arbeit wurde am Eduard-Zintl-Institut für Anorganische und Physikalische Chemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Gerd Buntkowsky in der Zeit von März 2018 bis Juli 2021 durchgeführt.



Inhalt

Inhalt	I
Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	VII
Danksagung	IX
1. Einleitung	1
2. Stand der Technik	3
2.1. Funktionalisierung von Biosystemen für selektive Markierungen	3
2.2. Markierung von Peptiden zur Anwendung in Hyperpolarisationsexperimenten	4
3. Techniken	9
3.1. Magnetische Kernresonanz	9
3.2. Elektronenspinresonanz	10
3.3. Festkörper-NMR-Spektroskopie	12
3.4. Hyperpolarisation	13
3.4.1. Dynamische Kernpolarisation	14
3.4.2. Chemisch induzierte, dynamische Kernpolarisation	17
3.4.3. Parawasserstoff-induzierte Polarisation	19
3.5. Festphasen-Peptidsynthese	21
4. Aufgabenstellung	25
4.1. Markierung von Fmoc-Aminosäuren für Anwendungen in Hyperpolarisationstechniken	25
4.2. Markierte Peptide mittels SPPS	26
4.3. Markierte Peptide durch Interkalationsreaktion in Disulfidbindungen	27
5. Funktionalisierung der Seitenkette von Fmoc-Aminosäuren	29
5.1. PROXYL-funktionalisierte Fmoc-Aminosäuren	29
5.1.1. Herstellung und Charakterisierung von C-terminal <i>tert</i> -Butyl-geschützten Fmoc-Aminosäuren	30
5.1.2. Herstellung und Charakterisierung von PROXYL-funktionalisierten und C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäuren	33
5.1.3. Herstellung und Charakterisierung von PROXYL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren	35
5.1.4. Zusammenfassung und Ausblick zu PROXYL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren	37
5.2. TOTAPOL-funktionalisierte Fmoc-Aminosäuren	38
5.2.1. Boc-Schätzung von TOTAPOL	39
5.2.2. Herstellung und Charakterisierung einer TOTAPOL-funktionalisierten und C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure	40
5.2.3. Herstellung und Charakterisierung einer TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure	41

5.2.4. Zusammenfassung und Ausblick der TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure	42
5.3. Benzophenon-funktionalisierte Fmoc-Aminosäuren	43
5.3.1. Herstellung und Charakterisierung einer Benzophenon-funktionalisierten C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure	43
5.3.2. Herstellung und Charakterisierung einer Benzophenon-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure	44
5.3.3. Zusammenfassung und Ausblick zu Benzophenon-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren	45
6.....Funktionalisierte Peptide	47
6.1. PROXYL-funktionalisierte Peptide	47
6.1.1. Reaktivierungsstudien der Radikale der funktionalisierten Peptide	54
6.1.2. Reproduktion der Biradikalpeptide mit angepasster Aufreinigung	59
6.1.3. Zusammenfassung und Ausblick für PROXYL-funktionalisierte Peptide	61
6.2. Seitenketten-Benzophenon-funktionalisiertes Peptid	63
7.....Amino-funktionalisiertes Dispiro-Radikal	65
8.....Bissulfon-basierte Markierungen für Interkalationsreaktionen in Disulfidbindungen von Biomolekülen für die Anwendung in DNP- und PHIP-Experimenten	67
8.1. Bissulfon-basierte Radikal- und Allyl-Markierungen	68
8.2. Bissulfon-basierte Radikal-Markierung von Eptifibatid	69
8.3. Bissulfon-basierte Allyl-Markierung von Eptifibatid	75
8.4. Zusammenfassung und Ausblick für Bissulfon-basierte Markierungen	78
9.....Zusammenfassung und Ausblick	81
10. ..Experimentalteil	85
10.1. Chemikalien	85
10.2. Lösungsmittelentfernung	85
10.3. Analytik	85
10.3.1. RP-HPLC	85
10.3.2. Ellmans Test	86
10.3.3. MS	86
10.3.4. NMR	86
10.3.5. ESR	87
10.3.6. Festkörper-DNP-NMR	87
10.3.7. PHIP-NMR	88
11. ..Synthesen	89
11.1. Synthese von C-Terminal <i>tert</i> -Butyl-geschützten Fmoc-Aminosäuren	89
11.1.1. Synthese von Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-O ^t Bu	89
11.1.2. Synthese von Fmoc-NH-L-Ser(OH)-O ^t Bu	90

11.1.3.Synthese von Fmoc-NH-L-Tyr(OH)-O ^t Bu	17	91
11.2. Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-1) PROXYL-Funktionalisierung von C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure an ihrer reaktiven Alkoholsektenkette		92
11.2.1.Synthese von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-O ^t Bu	21	92
11.2.2.Synthese von Fmoc-NH-L-Ser(O-PROXYL)-O ^t Bu	22	93
11.2.3.Synthese von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PROXYL)-O ^t Bu	23	93
11.3. Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-2) zur Entfernung der C-Terminalen <i>tert</i> -Butyl-Schätzung einer PROXYL-funktionalisierten Aminosäure		94
11.3.1.Synthese von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-OH	23	94
11.3.2.Synthese von Fmoc-NH-L-Ser(O-PRX)-OH	25	95
11.3.3.Synthese von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PRX)-OH	26	95
11.4. Synthese einer TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure		96
11.4.1.Synthese von HO-TOTAPOL-N-Boc	29	96
11.4.2.Synthese von Fmoc-NH-L-Glu(O-Totapol-N-Boc)-O ^t Bu	32	97
11.4.3.Synthese von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL)-OH	72	97
11.4.4.Synthese von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL-N-Boc)-OH	33	98
11.5. Synthese einer Benzophenon-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure		99
11.5.1.Synthese von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-O ^t Bu	35	99
11.5.2.Synthese von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH	36	99
11.6. Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-3) zur manuellen SPPS		100
11.7. Synthese Radikal-funktionalisierter Peptide und ihres Referenzpeptides		101
11.7.1.Synthese von HN-Pro-Hyp(tBu)-Ser(tBu)-Hyp(tBu)-Lys(Boc)-Gly-CTC-Resin	69	101
11.7.2.Synthese von HN-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	71	102
11.7.3.Synthese von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	37	103
11.7.4.Synthese von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	38	104
11.7.5.Synthese von Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	39	105
11.7.6.Synthese von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	42	106
11.7.7.Synthese von HN-Hyp(tBu)-Pro-Hyp(tBu)-Ser(tBu)-Hyp(PROXYL)-Lys(Boc)-Gly-CTC-Resin	70	107
11.7.8.Synthese von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly	41	108
11.7.9.Synthese von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly	44	109
11.7.10. Synthese von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly	40	110
11.7.11. Synthese von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly	43	111
11.7.12. Erneute Synthese von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	42	112
11.7.13. Erneute Synthese von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly	43	113
11.7.14. Erneute Synthese von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly	44	114
11.8. Synthese eines Benzophenon-funktionalisierten Tetra-Peptides und dessen Referenzpeptides		116
11.8.1.Synthese von NH-His-Glu(NH-Benzophenon)-Tyr-Gly-OH	45	116
11.8.2.Synthese von NH-His-Glu-Tyr-Gly-OH	46	117

11.9.	Synthese eines Amin-funktionalisierten Dispiro-Nitroxyl-Radikals	117
11.9.1.	Synthese von 3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on	51 117
11.9.2.	Synthese von 7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on	52 118
11.9.3.	Synthese von 15-amino-7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan	47 119
11.10.	Synthese einer Bissulfon-basierten Radikal- und einer Allyl-Markierung für Interkalationsreaktionen in Disulfidbindungen von Biomolekülen	120
11.10.1.	Synthese von Bisthioether	55 120
11.10.2.	Synthese von Bissulfon	56 120
11.10.3.	Synthese der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung	57 und 58 121
11.10.4.	Synthese der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung	59 und 60 122
11.11.	Radikal- und Allyl-Markierung in die Disulfidbindung von Eptifibatid mittels Bissulfon-basierten Markierungen durch Interkalationsreaktion	123
11.11.1.	Reduzierung von Eptifibatid zum Thiol	61 123
11.11.2.	Synthese von Radikal-markiertem Eptifibatid durch Interkalationsreaktion	62 124
11.11.3.	Synthese von Allyl-markiertem Eptifibatid durch Interkalationsreaktion	68 125
12.	..Anhang	127
12.1.	HPLC-, MS- und NMR-Daten von Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-O ^t Bu	15 127
12.2.	HPLC-, MS- und NMR-Daten von Fmoc-NH-L-Serin(OH)-O ^t Butyl	16 129
12.3.	HPLC-, MS- und NMR-Daten von Fmoc-NH-L-Tyrosin(OH)-O ^t Butyl	17 131
12.4.	HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-O ^t Bu	21 133
12.5.	HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Ser(O-PROXYL)-O ^t Bu	22 133
12.6.	HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PROXYL)-O ^t Bu	23 134
12.7.	HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PRX)-OH	23 135
12.8.	HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Ser(O-PRX)-OH	25 135
12.9.	HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PRX)-OH	26 136
12.10.	HPLC- und MS-Daten von HO-TOTAPOL-N-Boc	29 137
12.11.	HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Glu(O-Totapol-N-Boc)-O ^t Bu	32 137
12.12.	MS-Daten von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL)-OH	72 138
12.13.	HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL-N-Boc)-OH	33 138
12.14.	HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-O ^t Bu	35 139
12.15.	HPLC-, MS- und NMR-Daten von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH	36 140
12.16.	HPLC- und MS-Daten von HN-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	71 142
12.17.	HPLC- und MS-Daten von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	37 142
12.18.	HPLC- und MS-Daten von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	38 143
12.19.	HPLC- und MS-Daten von Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	39 144
12.20.	HPLC- und MS-Daten von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly	40 145
12.21.	HPLC- und MS-Daten von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly	41 146
12.22.	HPLC- und MS-Daten von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly	42 146
12.23.	HPLC- und MS-Daten von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly	43 147

12.24.	HPLC- und MS-Daten von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44	148
12.25.	HPLC- und MS-Daten der Reproduktion von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42	149
12.26.	HPLC- und MS-Daten der Reproduktion von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 43	150
12.27.	HPLC- und MS-Daten der Reproduktion von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44	150
12.28.	HPLC- und MS-Daten von NH-His-Glu(Benzopenon)-Tyr-Gly-OH 45	151
12.29.	HPLC- und MS-Daten von NH-His-Glu-Tyr-Gly-OH 46	152
12.30.	MS- und NMR-Daten von 3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 51	153
12.31.	MS-Daten von 7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 52	154
12.32.	MS- und ESR-Daten von 15-amino-7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan 47	155
12.33.	NMR-Daten von Bisthioether 55	156
12.34.	NMR-Daten von Bissulfon 47	157
12.35.	HPLC- und MS-Daten der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung 57 und 58	158
12.36.	HPLC-, MS- und NMR-Daten der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung 59 und 60	160
12.37.	HPLC- und MS-Daten des reduzierten Eptifibatid 61	162
12.38.	HPLC- und MS-Daten des Radikal-markierten Eptifibatid 62	163
12.39.	HPLC- und MS-Daten des Allyl-markierten Eptifibatid 68	163
	Abkürzungsverzeichnis	165
	Literaturverzeichnis	169
	Abbildungsverzeichnis	183
	Tabellenverzeichnis	193
	Verzeichnis der Schemata	195
	Erklärungen	199



Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Wissenschaftliche Veröffentlichungen in Erstautorenschaft

[1] M. de Oliveira*, K. Herr*, M. Brodrecht, N. B. Haro-Mares, T. Wissel, V. Klimavičius, T. Gutmann, G. Buntkowsky,

Solvent-free dynamic nuclear polarisation enhancements in organically modified mesoporous silica,

Physical Chemistry Chemical Physics, **2021**, 23, 12559-12568.

[2] K. Herr*, M. Fleckenstein*, M. Brodrecht, M. Höfler, T. Gutman, M. Reggelin, G. Buntkowsky,

A Novel Strategy for Site Selective Spin-Labeling to Investigate Bioactive Entities by DNP and EPR Spectroscopy

Scientific Reports, **2021**, 11, 13714.

[3] M. Fleckenstein*, K. Herr*, S. Knecht, M. Brodrecht, M. Reggelin, G. Buntkowsky,
PHIP applicable labeling strategy for disulfide bond consisting biomolecules

In Vorbereitung.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen aus Kooperationen

[1] D. Tietze, J. Sartorius, B. K. Seth, K. Herr, P. Heimer, D. Imhof, D. Mollenhauer, G. Buntkowsky,

New insights into the mechanism of nickel superoxide degradation from studies of model peptides,
Scientific Reports, **2017**, 7 (1), 1-15.

[2] M. Brodrecht, K. Herr, S. Bothe, M. de Oliveira, Jr., T. Gutmann, G. Buntkowsky,
Efficient Building Blocks for Solid-Phase Peptide Synthesis of Spin Labeled Peptides for Electron Paramagnetic Resonance and Dynamic Nuclear Polarisation Applications,
ChemPhysChem, **2019**, 20, 1475– 1487.

[3] Z. Li, L. Rösler, K. Herr, M. Brodrecht, H. Breitzke, K. Hofmann, H.-H. Limbach, T. Gutmann, G. Buntkowsky,
Dirhodium Coordination Polymers for Asymmetric Cyclopropanation of Diazooxindoles with Olefins: Synthesis and Spectroscopic Analysis,
ChemPlusChem, **2020**, 85, 1737–1746.

Vorträge

[1] K. Herr, M. Brodrecht, M. de Oliveira Jr., V. Klimavičius, G. Buntkowsky,
Spin Label Strategies for Biosystems,
AK Treffen, Höchst im Odw., 03/**2019**.

[2] M. Brodrecht, K. Herr, M. de Oliveira Jr., V. Klimavičius, G. Buntkowsky,
Introducing Labels into Biosystems,
Projekttreffen DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) / RFBR (Russian Foundation for Basic Research),
Kooperationsprojekt, Darmstadt, 03/**2019**.

Konferenz- und Tagungsbeiträge

[1] M. Brodrecht, K. Herr, B. Kumari, H. Breitzke, T. Gutmann, G. Buntkowsky,
Synthesis of Peptide Functionalized Silica Nano Pores and their Characterization by Solid State NMR,
AMPERE NMR School, Zakopane, Poland, 06/**2018**.

[2] K. Herr, M. Brodrecht, S. Bothe, M. de Oliveira, Jr., T. Gutmann, G. Buntkowsky
Synthesis of SPPS applicable Building Blocks suitable for Electron Paramagnetic Resonance and Dynamic Nuclear Polarisation NMR,
Doktorandentag, Darmstadt, Germany 01/**2019**.

[3] K. Herr, M. Brodrecht, S. Bothe, M. de Oliveira, Jr., T. Gutmann, G. Buntkowsky
Introducing Spin Labels in Peptides by functionalized Amino Acid Building Blocks for EPR and DNP Applications,
3rd International Caparica Christmas Congress on Translational Chemistry. Caparica/Lisbon, Portugal, 12/**2019**

Danksagung

Eine Dissertation ist geprägt von Höhen und Tiefen. In diesem Verlauf gab es viele Menschen, die mich unterstützt haben, sei es durch eine wissenschaftliche Diskussion oder ein persönliches Gespräch. Hierfür möchte ich mich bei allen bedanken, die für mich da waren.

An erster Stelle danke ich meiner Frau für ihre Unterstützung und Geduld.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gerd Buntkowsky dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit bekam bei ihm meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen. Ich bedanke mich für das Vertrauen sowie die fachliche und persönliche Weiterentwicklung, die mir diese Forschungsarbeit ermöglicht hat. Durch die eigenständige Arbeitsanforderung ergab sich ein sehr guter und konstruktiver Rahmen für meine Dissertation. Besonders gut konnte ich mich mit den immer neuen Herausforderungen und dem Ausbauen von Kooperationen im interdisziplinären und internationalen Kontext weiterentwickeln.

Im Weiteren bedanke ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Harald Kolmar für das Erstellen des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin Brodrecht, der mir während der Durchführung meiner Thesis stets zur Seite stand.

Speziell bedanke ich mich bei PD Dr. Torsten Gutmann, Prof. Dr. Marcos de Oliveira Jr., Dr. Hergen Breitzke und Dr. Stephan Knecht für die Durchführung der DNP-, der Festkörper- und PHIP-NMR-Messungen. Alle vier „NMRler“ konnten mich auf dem Feld der NMR-Techniken weiterbilden und waren verlässliche Wegbegleiter sowohl wissenschaftlich als auch privat.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. David Rosenberger für das Erstellen der MD-Simulationen.

Für die herausragenden Leistungen bedanke ich mich bei meinen studentischen Mitarbeitern (B.Sc. René Steinbrecher, B.Sc. Constanze Sixt) und meinem Masteranden (M.Sc. Till Wissel). Sie konnten mich durch die engagierte Übernahme von Aufgaben einerseits entlasten und andererseits mit ihren wissenschaftlichen Arbeiten weiterhelfen, um diese Arbeit anzufertigen. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gute Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft.

Besonders möchte ich den Kollegen danken, ohne die viele Ergebnisse dieser Arbeit nie entstanden wären. Hierzu gehören Dr. Max Fleckenstein für die erfolgreiche Arbeitsgruppen übergreifende Kooperation, Dr. Sarah Bothe und M.Sc. Mark Valentin Höfler für die Durchführung von DNP-NMR-Messungen und Dr. Marcos de Oliveira Jr. für die Unterstützung bei den ESR-Messungen und weiterführenden DNP-Messungen.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Korrekturlesern dieser Arbeit, insbesondere bei Dr. Martin Brodrecht, Dr. Hergen Breitzke, und M.Sc. Lorenz Rösler.

Ein weiterer Dank geht an Christiane Rudolph für die Anfertigung der Massenspektren und ihre wissenschaftliche Hilfestellung.

Ein besonderer Dank geht an das Büro D208 und Lorenz Rösler für die Verbesserung des Betriebsklimas.

Ich möchte all meinen Freunden danken. Sie haben mir stets den Rücken gestärkt und waren sowohl innerhalb als auch außerhalb der Uni immer für mich da.

Ein zusätzlicher Dank geht zudem an meine Familie, die mich stets unterstützt hat.

1. Einleitung

Effizienter Fortschritt im Bereich der Biochemie und Biomedizin erfordert eine enge Zusammenarbeit von synthetischer und analytischer Chemie. So können große Fragestellungen gelöst und ein tieferes Verständnis von Prozessen in diesen Bereichen gewonnen werden. Dabei entwickeln synthetisch und analytisch arbeitende Chemiker gemeinsam Techniken oder kombinieren sie. Hierbei sind die Kernspinresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance*, NMR) und die Magnetresonanztomographie (MRT oder auch *magnetic resonance imaging*, MRI) leistungsstarke Analysewerkzeuge mit vielfältigen Anwendungen in biophysikalischen und medizinischen Wissenschaften. Die Stärke der NMR liegt in der Bandbreite der verfügbaren Informationen und ihrer Fähigkeit, Struktur und Dynamik auf Längenskalen vom molekularen bis zum mesoskopischen Bereich und auf Zeitskalen von Mikrosekunden bis zu Tagen zu untersuchen. Während die NMR von einem reichen Informationsgehalt profitiert, leidet sie im Vergleich zu anderen analytischen Techniken wie der Elektronenspinresonanz (ESR oder auch *electron paramagnetic resonance*, EPR) unter einer geringen inhärenten Empfindlichkeit. Die Empfindlichkeit eines NMR-Experiments beruht im Wesentlichen auf der Besetzungszahldifferenz von Kernspinzuständen und hängt somit von der Temperatur, dem Magnetfeld, dem gyromagnetischen Verhältnis des zu untersuchenden Kerns und der Anzahl der Kernspins ab. Dies führt in der Regel zu einer geringen Kernspinpolarisation im thermischen Gleichgewicht. Dieses Problem kann gelöst werden, indem die Kernspinpolarisation über die durch die Boltzmann-Verteilung im Detektionsfeld vorgegebene Größe hinaus erhöht wird. Dieser Ansatz wird als Hyperpolarisation bezeichnet. Hierbei ist die Hyperpolarisationstechnik, die als dynamische Kernpolarisation (*dynamic nuclear polarisation*, DNP)¹⁻⁹ bezeichnet wird, bis heute eine der effektivsten Techniken zur NMR-Signalverstärkung im Festkörper. Sie kombiniert den Informationsgehalt der NMR mit der Sensitivität der ESR. Neben der DNP-NMR existieren auch die chemisch induzierte DNP (*chemically induced dynamic nuclear polarisation*, CIDNP)¹⁰⁻¹⁵, welche sowohl im Festkörper als auch in Lösung zur Anwendung kommen kann sowie die Parawasserstoff-induzierte Polarisation (*para hydrogen induced polarisation*, PHIP)¹⁶⁻¹⁹, die hauptsächlich in Flüssigkeits-NMR Experimenten Anwendung findet.²⁰⁻²¹

Um die Aufklärung komplizierter Strukturen oder Oberflächen mittels Hyperpolarisation zu ermöglichen, werden geeignete markierte chemische Verbindungen benötigt. Für diesen Zweck sollen im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche chemische Strukturelemente als Markierungen entwickelt werden, die DNP- oder PHIP-aktiv sind, um diese gezielt in

biologische Systeme integrieren zu können. Hierbei können Radikal-²², Allyl-¹⁷ oder Benzophenon²³-Verbindungen zur Anwendung kommen. Diese Markierungen können nach oder während des Aufbaus des Zielmoleküls eingebunden werden.²⁴⁻³⁰

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Synthese von neuartigen Verbindungen, die für Messtechniken der Hyperpolarisation in der NMR (Kapitel 3. Techniken) verwendet werden sollen. Die Arbeit befasst sich mit der Herstellung und Charakterisierung von Radikal und Benzophenon-funktionalisierten Fluorenylmethoxycarbonyl-Aminosäuren (Fmoc-Aminosäuren) und ihrem Einbau in Modell-Peptide für DNP- und CIDNP-NMR Anwendungen. Des Weiteren wird die Herstellung eines Interkalators mit Allyl- sowie Radikal-Markierung realisiert und der Einbau in die Disulfidbindung eines Biomoleküls gezeigt. Das resultierende, markierte Biomolekül soll es ermöglichen neue Anwendungen der Hyperpolarisation für DNP- und PHIP-NMR zu schaffen.

Die Arbeit ist wie folgt gegliedert. Nach der Einleitung wird im Kapitel 2 der Stand der Forschung beschrieben.

Kapitel 3 beschäftigt sich mit den Techniken, die für diese Arbeit von Relevanz sind. Dabei werden zunächst die Hyperpolarisationstechniken eingeführt und anschließend die Synthesestrategie der Festphasensynthese beleuchtet.

Nach kurzer Darstellung der Aufgabenstellung in Kapitel 4 werden die Ergebnisse der Arbeit in den Kapiteln 5 bis 8 vorgestellt und diskutiert.

Dies beginnt mit der Synthese von funktionalisierten Fmoc-Aminosäure-Bausteinen in Kapitel 5 und ihren Einbau in Modell-Peptide in Kapitel 6.

In Kapitel 7 wird die Synthese eines Amino funktionalisierten Dispiro-Monoradikals vorgestellt und schließlich die Ergebnisse der Interkalation von Radikal- und Allyl-Markierungen in Disulfidbindungen eines bioaktiven Peptides in Kapitel 8 dargestellt und diskutiert.

Abschließend werden die erhaltenen Ergebnisse in Kapitel 9 zusammengefasst, diskutiert und ein Ausblick für weitere Forschungsmöglichkeiten auf Basis dieser Arbeit gegeben.

Hieran schließt sich das Literaturverzeichnis an.

2. Stand der Technik

2.1. Funktionalisierung von Biosystemen für selektive Markierungen

Funktionalisierungen von Biosystemen können prinzipiell auf zwei Arten geschehen: Post-synthetisch oder während der Synthese. So können Markierungen individuell je nach Anforderungen des Systems eingebunden werden.

Um selektive Markierungen während der Synthese in Biosysteme einzuführen, muss zwischen großen und kleinen Molekülen sowie der damit einhergehenden Methode unterschieden werden. Für kleine Moleküle (kurze Peptide bis ca. 50 Aminosäuren) kann dies durch Festphasen-Peptidsynthese (*solid state peptide synthesis*, SPPS) unter Verwendung funktionalisierter kanonischer oder nichtkanonischer Boc-³¹ oder Fmoc-Aminosäuren³² erfolgen.^{17, 33-34} Für größere Peptide kann ergänzend zur SPPS die Ligation³⁵ von zwei Peptidteilen verwendet werden. Für eine Funktionalisierung bzw. Markierung größerer Moleküle, wie Proteinen, können diese in Eukaryoten wie *E. coli* (*Escherichia coli*) hergestellt werden. Dabei wird die Protein-Biosynthese via Genexpression durch Translation in Ribosomen angewendet, wobei nicht kanonische Aminosäuren eingesetzt werden können.³⁶⁻³⁸

Die postsynthetische Markierung von Biomolekülen kann durch Ausnutzung bereits vorhandener, spezieller Strukturelemente realisiert werden, ohne eine spezielle bzw. einzigartige Bindungsstelle einzubauen. So steht in mittels SPPS hergestellten, noch geschützten Peptiden der C-Terminus für Funktionalisierungen zur Verfügung.³⁹ Es wird also die vorgegebene Struktur zum Zweck der Markierung verwendet. In diesem Zusammenhang können sowohl in Proteinen wie auch in kleineren Peptiden Cysteine, die meist zur Ausbildung der Tertiärstruktur durch Disulfidbindungen dienen, in Funktionalisierungsreaktionen verwendet werden.^{24, 40-45}

Das wissenschaftliche Interesse an markierten Peptid-basierten Molekülen und deren Anwendung als bioaktive Moleküle für die diagnostische Bildgebung wächst stetig.⁴⁶ Sie vereinen die Vorteile einfacher Synthese, kleiner Größe, veränderbarer Zieleigenschaften, geringerer Immunogenität und Zytotoxizität.⁴⁷ Einsatz finden sie in bildgebenden Verfahren wie der Szintigraphie,⁴⁸ MRT,⁴⁹ PET (Positronen-Emissions-Tomographie)⁵⁰ oder der HyperSense⁵¹⁻⁵⁶ Hyperpolarisation, einer Form der DNP-NMR.

2.2. Markierung von Peptiden zur Anwendung in Hyperpolarisationsexperimenten

Die Modifikation von Peptiden durch Markierungen kann durch eingebundene Funktionalisierungen erreicht werden. Die Modifikationsmöglichkeiten mittels Markierungen orientieren sich dabei stark an den gegebenen Strukturen von biologischen Systemen mit ihren kleinsten Bausteinen, den Aminosäuren. Dabei werden die Modifikationen durch generierte oder gegebene Funktionalitäten der Aminosäuren eingebunden.⁵⁷⁻⁵⁹

Es ist möglich durch SPPS Markierungen in Peptide zu integrieren. So lassen sich Radikal-, Allyl- oder Benzophenon-Verbindungen mit den Funktionalitäten einer Carboxyl- und einer Aminogruppe als nichtkanonische Aminosäure einbauen. Wichtige Bausteine sind TOAC 1 (2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-*N*-oxid-4-amino-4-carboxylsäure), L-Serin(Propargyl)-OH 2 sowie 4-Benzoyl-L-phenylalanin 3 die in Abbildung 2-1 gezeigt werden.^{38, 57-59}

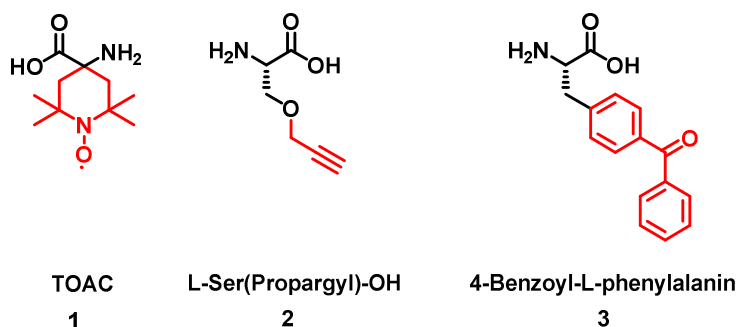
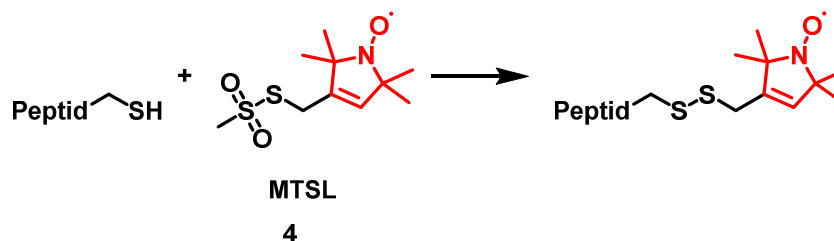


Abbildung 2-1: Chemische Struktur von TOAC 1, L-Ser(Propargyl)-OH 2 und 4-Benzoyl-L-phenylalanin 3.

Diese Verbindungen können für den selektiven Einbau einer Markierung in Peptide basierend auf Fmoc-Aminosäuren verwendet werden. Hierbei ist es wichtig, dass diese funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren in allen Syntheseschritten auch unter stark aziden Bedingungen stabil bleiben und, dass Radikale nicht reduziert werden und somit aktiv bleiben.

Eine weitere Möglichkeit ergibt sich aus der Verwendung einer gegebenen Funktionalität einer bestimmten Aminosäure. Cystein besitzt z. B. eine Thiofunktionalität an seiner Seitenkette, wodurch sich die Möglichkeit eines selektiven Einbaus einer Markierungsmodifikation ergibt. Es ist jedoch äußerst selten, dass Biosysteme ungepaarte Thiolgruppen enthalten.⁶⁰ Aus diesem Grund müssen sie künstlich in die Sequenz eingebaut werden. Im Gegensatz dazu sind gepaarte Thiolgruppen, sogenannte Disulfidbindungen, in therapeutisch relevanten Biomolekülen häufig vorhanden. Solche Disulfidbindungen können leicht reduziert werden, um reaktive, ungepaarte Thiolgruppen zu erzeugen, die als nukleophile Angriffspunkte für eine Vielzahl von Modifikationen genutzt werden können.^{24, 42-43, 45, 61-63}

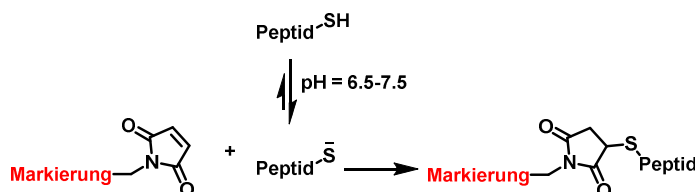
Der entscheidende Vorteil der Adressierung von Thiolen in Peptiden oder Proteinen ist die Möglichkeit der ortsselektiven Markierung ohne Beeinträchtigung der konformationellen Integrität des Substrats.⁶⁴ So können Methanthiosulfonate für eine gezielte Anbindung einer Markierung durch den Ausbau von Disulfidbindungen mit freien Thiolen verwendet werden, wie am Beispiel einer Spin-Markierung mittels MTSL 4 (*S*-(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methansulfonothioat) gezeigt wurde (siehe Schema 2-1).⁵⁹



Schema 2-1: Beispiel der Spinmarkierung eines hypothetischen Biosystems durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen einer freien Thiolgruppe im Peptid mit einem Methanthiosulfonat-funktionalisierten Radikal **4** (*S*-(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methansulfonothioat, MTSL).

Der Nachteil dieser Reaktion ist die Reversibilität der Bindung durch reduktive Spaltung der Bindung sowie die Notwendigkeit eines einzelnen Cystein im biologischen Zielsystem. So ist diese Variante der Radikal-Markierung mit Systemen mit mehr als einem Cystein nicht mehr selektiv möglich.⁴⁰

Das durch KOLB, FINN und SHARPLESS etablierte Konzept der Click-Chemie ermöglicht es quantitativ und selektiv Modifikationen in Moleküle einzubinden, wodurch auch der Einbau einer Markierung möglich ist. So können sowohl durch Thiol-Maleimid- als auch Azid-Alkin-Kopplungen gewünschte Modifikationen gezielt eingebunden werden. Hierbei kann eine reaktive Seitenkette, z. B. das Thiol eines Cysteins, in biologische Systeme eingebunden, bzw. vorhandene Thiofunktionalitäten für die Bindung mit einem Maleimid verwendet werden (siehe Schema 2-2).⁶⁵⁻⁶⁷

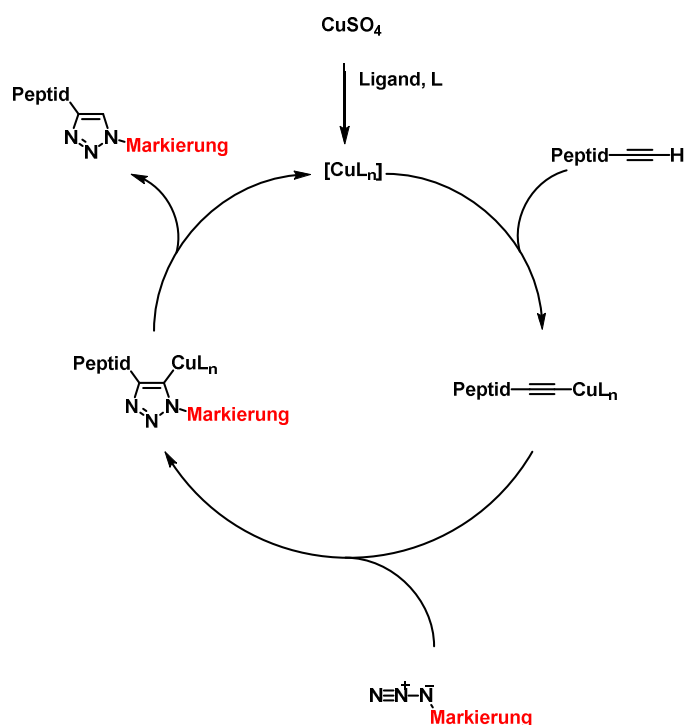


Schema 2-2: Lösungsmittel-unterstützte Thiol-Maleimid-Kopplung einer möglichen Markierung eines Peptides mit Thiol-Funktionalität.

Die Markierung kann mittels Maleimid-Funktionalität aktiviert und für Thiol-En-Reaktionen verwendet werden. Der Aufbau der Maleimid-Funktionalität mit zwei aktivierenden

Carbonylgruppen in cis-Konformation zusammen mit der Ringspannung der C-C-Doppelbindung macht diese Verbindung besonders reaktiv in Bezug auf Thiol-En-Reaktionen. Dadurch verläuft diese Reaktion sehr schnell. Maleimid reagiert in Dimethylformamid oder gepuffertem Wasser bei einem pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5 selektiv mit Thiolen ohne einen Katalysator zu benötigen.⁶⁶

Eine weitere Form der Click-Chemie stellt die Azid-Alkin-Kopplung dar, in welcher gezielt die Funktionalität eines Azids oder Alkins in Strukturen eingebunden wird, um anschließend das Konjugat mit der entgegengesetzt funktionalisierten Modifikation unter Metallkatalyse zu bilden. Die Verwendung dieser Reaktionsart findet vor allem Anwendung, wenn zu viele funktionelle Gruppen vorhanden sind, wodurch eine selektive Reaktion nicht gegeben wäre. Im Vergleich zur Thiol-En-Reaktion, welche nur selektiv abläuft, wenn genau eine Thiol-Gruppe vorhanden ist, bietet die Azid-Alkin-Kopplung den Vorteil, dass Alkin- und Azid-Gruppen in fast keinem natürlichen Systemen vorkommen. Der Nachteil ist hierbei jedoch, dass die geringe intrinsische Reaktionsrate dieser Kopplung durch einen Katalysator gesteigert werden muss, da höhere Temperaturen bei biologischen Systemen zur Denaturierung oder Zersetzungsreaktionen führen würden. Des Weiteren führen nicht vollständig abgetrennte Kupfer-Katalysatoren in NMR Experimenten durch Paramagnetismus zur Verbreiterung der Signale. In Schema 2-3 ist der allgemeine Verlauf einer solchen Kopplung dargestellt.⁶⁷



Schema 2-3: Allgemeine Darstellung einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Kopplung zur Markierung von Peptiden.⁶⁷

Dargestellt sind die beiden Hauptstrategien zur Markierung von Biosystemen. Auf der einen Seite wird während der Synthese die Markierung eingebunden und die Seitenkette einer für die Festphasen-Peptidsynthese geeigneten Aminosäure genutzt. Auf der anderen Seite ist die Verwendung post-synthetischer Markierungen unter Ausnutzung bereits vorhandener oder künstlich eingeführter Funktionalitäten mit hoher spezifischer Ausrichtung, wie z. B. Cysteinseitenketten, dargestellt.

Die gängigsten Markierungsstrategien folgen dem Post-Synthese-Ansatz (*top-down-Prinzip*). Dabei wird die höchste Selektivität erreicht, wenn nur eine spezielle, natürliche oder künstliche Funktionalisierung im Biosystem vorkommt. Der Nachteil ist die notwendige Zugänglichkeit der Funktionalität in größeren Molekülen zu erreichen. Ebenso ist die Tatsache, dass im Falle von zwei gleichen, natürlich vorkommenden reaktiven Gruppen keine selektive Reaktion möglich ist und eine künstliche, reaktive Gruppe eingeführt werden muss. Das führt zu aufwendigen Synthesen, kosten-intensiven Verbindungen oder metallischen Verunreinigungen. Eine Alternative würde die Umstellung der Strategie zum *Bottom-Up-Prinzip* darstellen, bei dem die Markierung während der Synthese mittels SPPS eingebaut werden würde. Diese Strategie ist jedoch zumeist mit aufwendigen Synthesen für geeignete nichtkanonische Aminosäure-Bausteine bzw. mit hohen Kosten bei der Anschaffung dieser verbunden. Somit ist die Entwicklung neuartiger Markierungen für Biomoleküle erstrebenswert.



3. Techniken

3.1. Magnetische Kernresonanz

Nach ihrer Entdeckung durch BLOCH⁶⁸ und PURCELL *et al.*⁶⁹ im Jahr 1946 wurde die Kernspinresonanz (*nuclear magnetic resonance*, NMR) zu einem der am häufigsten verwendeten analytischen Werkzeuge für die Charakterisierung von chemischen Verbindungen, biomolekularen Anordnungen oder Materialien auf atomarer Ebene. Eine geringe natürliche Linienbreite und lange Lebensdauern der angeregten Zustände liefern detaillierte Informationen über minimale Variationen des lokalen Magnetfeldes aufgrund der lokalen Elektronendichteverteilung (d. h. der chemischen Abschirmung) oder anderer Spins (d. h. der Spin-Spin-Kopplungen). Diese Wechselwirkungen sind im Allgemeinen anisotrop, werden aber in Lösung unter der Annahme einer schnellen, isotropen Rotation des Analytmoleküls auf ihre isotrope Größe gemittelt.

Im Festkörper tritt jedoch eine anisotrope Linienverbreiterung auf, die die Empfindlichkeit drastisch reduziert und zu einer starken Überlappung von Einzelresonanzen führen kann. Außerdem dominieren oft starke Dipol-Dipol-Wechselwirkungen über die chemischen Verschiebungen, insbesondere wenn ^1H beteiligt ist. In der modernen Festkörper-NMR wird die Empfindlichkeit durch Kreuzpolarisationstransfer (CP) von ^1H erhöht sowie die dipolare Wechselwirkung durch *high power* ^1H -Entkopplung, und *Magic-Angle-Spinning* (MAS) weitgehend reduziert.⁷⁰⁻⁷¹ Prinzipiell können anisotrope Wechselwirkungen wie *Chemical-Shift-Anisotropy* (CSA) und Dipol-Dipol-Kopplungen durch MAS gemittelt werden, erfordern jedoch sehr hohe Spinning-Frequenzen.⁷²⁻⁷⁴

Infolgedessen ist die Auflösung der Festkörper-NMR im Vergleich zur hochauflösenden NMR in Flüssigkeiten deutlich reduziert, und die Empfindlichkeit der NMR im Allgemeinen ist aufgrund der kleinen Zeeman-Energieaufspaltung intrinsisch niedrig: Der magnetisch angeregte Spin-Zustand (z. B. $|\beta\rangle$ für ^1H) ist aufgrund der stochastischen Anregung durch thermische Energie fast genauso stark besiedelt wie der Grundzustand ($|\alpha\rangle$ für ^1H). Unter typischen Bedingungen liegt im thermischen Gleichgewicht eine Zeeman-Polarisation von nur ~ 100 ppm vor, d.h. nur dieser Bruchteil der Kernspins trägt zum messbaren Netto-Resonanz-Absorptionssignal bei. Daher erfordert die NMR typischerweise die Mittelung über sehr viele freie Induktionszerfälle (*free induction decay*, FID), um das Signal-Rausch-Verhältnis zu erhöhen. Da dieses Verhältnis nur mit der Quadratwurzel aus der Anzahl der addierten Transientensignale ansteigt, könnte ein enormer Gewinn an Empfindlichkeit erzielt werden, wenn die Kernspins nur einen Eigenzustand besetzen würden, bzw. die

Besetzungszahldifferenz stark erhöht werden kann. Thermisch ist die selektive Besetzung des energetisch niedrigsten Eigenzustandes nur bei 0 K möglich und damit unter praktischen Bedingungen nicht realisierbar. Allerdings kann schon eine Erhöhung der Polarisierung (relativer Besetzungsunterschied) um einen signifikanten Betrag die NMR-Empfindlichkeit dramatisch erhöhen.⁷

3.2. Elektronenspinresonanz

Während sich die Strukturen von diamagnetischen Verbindungen sehr gut durch NMR analysieren und beschreiben lassen, tritt bei paramagnetischen Substanzen eine Linienverbreiterung durch die stark verkürzte Relaxation auf, welche die Aufklärung von Strukturen einer paramagnetischen Verbindung mit NMR immens erschwert. Die Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (ESR oder auch *electron paramagnetic resonance*, EPR) ermöglicht es hoch sensitiv paramagnetische Verbindungen zu analysieren. Allerdings kann sie diamagnetische Substanzen nicht charakterisieren. Das Prinzip der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie erinnert in vielerlei Hinsicht an die NMR-Spektroskopie, wobei hier die Spins von Elektronen und nicht die der Atomkerne angeregt werden (siehe Abbildung 3-1).²⁰

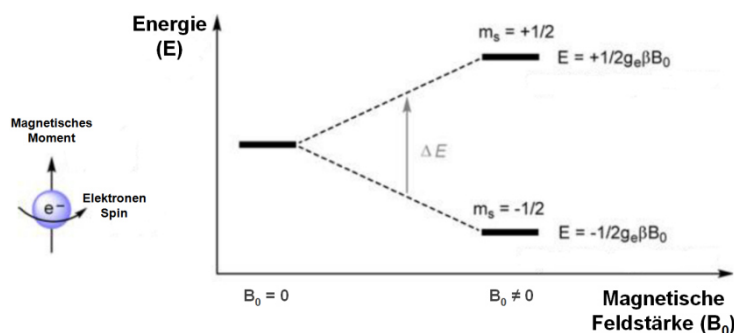


Abbildung 3-1: Aufspaltung des Energieniveaus eines Elektronenspins erzeugt durch ein angelegtes magnetisches Feld.²⁰

In der ESR-Spektroskopie werden gepulste als auch CW-Experimente (*continuous wave*, CW) verwendet, wobei letztere in kommerziellen Systemen vorwiegend verwendet werden. Im CW-Aufbau wird die zu untersuchende Probe mit Mikrowellen einer bestimmten Frequenz (z. B. ~ 9 GHz für das X- oder ~ 35 GHz für das Q-Band) bestrahlt, während das angelegte Magnetfeld den Bereich der Resonanzbedingungen durchläuft. Wenn die Energiedifferenz der zwei Elektronenspinzustände, welche proportional zur magnetischen Feldstärke ist, gleich der

Energie der einfallenden Photonen ist, entsteht ein ESR-Signal aufgrund der Photonenabsorption. Die Resonanzbedingungen sind durch die folgende Gleichung beschrieben:⁷⁵

$$h\nu = g\beta B \quad (1)$$

Hierbei ist h die Planck-Konstante, ν die Mikrowellenfrequenz, β das Bohrsche Magneton, B die Magnetfeldstärke und g der dimensionslose g -Faktor, welcher von der Umgebung des ungepaarten Elektrons abhängt. Für ein freies Elektron ist der g -Faktor $g_e = 2,0023$. Der g -Faktor bestimmt bei welcher Feldstärke ein ESR-Signal während eines CW-Experiments auftaucht. Die ESR-Spektroskopie detektiert nur solche Verbindungen, welche ungepaarte Elektronen besitzen, wie paramagnetische Übergangsmetalle oder organische Radikale. Gepaarte Elektronen in einem Orbital besitzen antiparallelen Spin basierend auf dem Pauli-Prinzip und bilden dadurch den ESR-insensitiven diamagnetischen Singulett-Zustand. Die ESR-Spektroskopie ist aufgrund des 3 Größenordnungen größeren gyromagnetischen Verhältnisses des Elektrons ($1,76 \cdot 10^{11} \text{ s}^{-1} \text{ T}^{-1}$) im Vergleich zum gyromagnetischen Verhältnis von Kernen ($2,675 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{ T}^{-1}$ für ^1H) theoretisch mehrere Größenordnungen sensitiver als NMR-Spektroskopie. Dies ermöglicht das Detektieren kleinster Bestandteile der zu analysierenden Substanzen, welche ungepaarte Elektronen besitzen.²⁰

Die Phänomene der Spin-Bahn-Interaktion und der Hyperfein-Kopplung sind sehr nützliche chemische Analysewerkzeuge, um die Umgebung eines Elektrons zu beschreiben. Wenn ein Elektron zu einem Atom zugehörig ist, dann unterscheidet sich der g -Faktor von g_e abhängig von der Spin-Orbit-Interaktion, deren Physik analog zur chemischen Abschirmung der NMR-Spektroskopie ist. In einem ESR-Experiment produziert der Kern ein zweites magnetisches Feld, das die Resonanzfrequenz des freien Elektrons verschiebt. In organischen Verbindungen ist diese Interaktion sehr gering, wogegen schwere Elemente wie Metalle eine signifikante Information über die Umgebung des Elektrons geben können. Durch die zusätzlichen Informationen der Hyperfein-Kopplung ist es möglich die Identität und die Oxidationsstufe eines metallzentrierten Radikals zu bestimmen.²⁰ Die Hyperfein-Kopplung entsteht durch die Interaktion zwischen dem Spin eines Elektrons mit dem eines Kerns. Entgegen der Spin-Bahn-Interaktion, welche die Position der Resonanzlinie verschiebt, spaltet die Hyperfein-Kopplung das Signal in Multipletts auf. Wenn ein Elektronenspin an N äquivalente Kerne mit Spin S koppelt, dann wird das ESR-Signal in $2NS+1$ Linien mit einer bi- oder multi-nominalen Verteilung der Intensitäten aufgespalten. In Abbildung 3-2 ist die Hyperfein-Kopplung exemplarisch für ein simuliertes ESR-Spektrum eines Methylradikals

gezeigt.²⁰ Die Aufspaltung in vier Linien wird hier durch die Kopplung des Elektronenspins mit den drei äquivalenten ^1H -Kernen mit Spin $\frac{1}{2}$ verursacht.

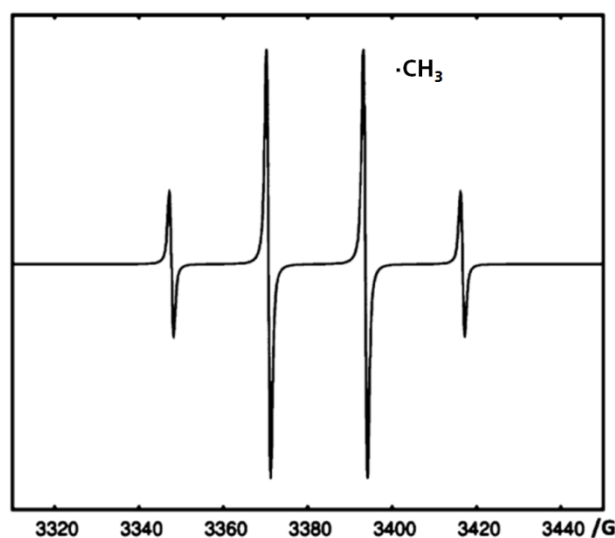


Abbildung 3-2: Simuliertes ESR-Spektrum mit exemplarischer Hyperfein-Kopplung am Beispiel eines Methylradikals [$\cdot\text{CH}_3$] mit der Anzahl der Linien = $2NS + 1 = 2 \cdot 3 \cdot \frac{1}{2} + 1 = 4$.²⁰

Trotz der hohen Sensitivität, der Spin-Bahn-Interaktion und der Hyperfein-Kopplung ist es für organische Substanzen sehr schwierig genaue Aussagen über ihre gesamte Struktur anhand von ESR-Daten zu erhalten. Hier können meist nur Aussagen über die direkte Umgebung der Radikale und ihre Konfiguration getroffen werden.⁷⁶

3.3. Festkörper-NMR-Spektroskopie

Die Festkörper-NMR-Spektroskopie ist eine herausragende Technik zur Identifikation von chemischen Verbindungen sowie zur Bestimmung molekularer Strukturen. Ihre Vielseitigkeit basiert auf verschiedenen Interaktionen, welche die Informationen der lokalen elektronischen Umgebung der Kerne oder auch Inter-Spin-Distanzen bereitstellen. Dadurch lassen sich Informationen über Verbindungsart und Konformation erhalten. Über die letzten Dekaden wurden diverse zum Teil multidimensionale NMR-Experimente unter magischen Winkel Bedingungen (MAS)^{73, 77} entwickelt, welche eine maßgeschneiderte Extraktion der gewünschten Strukturinformationen mit einer hohen Auflösung des Spektrums ermöglichen.⁷⁸⁻⁸⁴

Da MAS-NMR nicht auf der Mittelung der Anisotropie-Interaktionen durch schnelles molekulares Rotieren der zu analysierenden Moleküle basiert, ist diese Technik nicht durch die Molekülgröße limitiert, so wie die hochauflösende NMR in Lösung. Dies macht

MAS-NMR besonders attraktiv für Strukturanalysen von großen oder unlöslichen Biomolekülen, ihren Komplexen sowie Funktionsmaterialien. Insbesondere niederdimensionale Strukturen (Oberflächenschichten, Fibrillen und zweidimensionale Anordnungen) und Strukturen mit fehlender Fernordnung (z. B. Mikrokristalle und amorphe Systeme) sind unzugänglich für Röntgenstrukturanalysen und somit von besonderem Interesse für MAS-NMR. Durch diese Technik gelang es viele Probleme der Strukturanalysen von biologischen Verbindungen zu lösen, zum Beispiel amyloidogene Peptide und Proteine innerhalb von Fibrillen⁸⁵⁻⁸⁹, große oligomere Komplexe⁹⁰ und Membranproteine⁹¹⁻⁹². Ebenso wurden große Fortschritte in der Untersuchung von Spezies innerhalb der Umgebung einer ganzen biologischen Zelle erzielt.⁹³⁻⁹⁵ In der Materialwissenschaft konnte MAS-NMR für die Untersuchung der Struktur von Katalysatoren⁹⁶⁻⁹⁷, Funktionsmaterialien⁹⁸⁻⁹⁹, Energiematerialien^{91, 100}, Polymeren¹⁰¹⁻¹⁰³, Geomaterialien^{91, 104-105} oder makroporösen Materialien¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ angewendet werden.

3.4. Hyperpolarisation

Die geringe intrinsische Sensitivität der NMR-Spektroskopie, aufgrund der kleinen thermischen Besetzungsunterschiede der Spinzustände, begrenzt die Anwendung dieser Technik ebenso wie ihre langen Messzeiten. Bis zu einem bestimmten Grad können tiefe Temperaturen und hohe externe magnetische Felder zu einer Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses führen.¹⁰⁹ Eine Beschreibung kann durch die Einführung der Spinpolarisation P nach Gleichung (2) erfolgen,

$$P = \frac{n_2 - n_1}{n_2 + n_1} = \tanh \left(\frac{\gamma \hbar B_0}{2k_B T} \right) \quad (2)$$

wobei letzterer Ausdruck im thermischen Gleichgewicht gilt. Dabei ist γ das gyromagnetische Verhältnis des Kerns, \hbar und k_B sind die reduzierte Planckkonstante und die Boltzmannkonstante und n_1 , n_2 die Besetzungszahlen der Niveaus. Neben der Variation des externen Magnetfeldes B_0 und der Temperatur T kann eine größere Polarisation erreicht werden, wenn Hyperpolarisationstechniken angewendet werden. Dadurch können deutlich größere, nicht thermische Populationsunterschiede generiert werden. Typische Techniken sind die dynamische Kernpolarisation (DNP)¹¹⁰⁻¹¹¹ die chemisch induzierte dynamische Kernpolarisation (*chemically induced dynamic nuclear polarisation*, CIDNP)¹¹², das *spin exchange optical pumping* (SEOP)¹¹³ und die Parawasserstoff-induzierte Polarisation (*parahydrogen induced polarisation*, PHIP)¹¹⁴.

3.4.1. Dynamische Kernpolarisation

Bereits in der Anfangszeit der Entwicklung von ESR- und NMR-Techniken in den 1950er Jahren hatte OVERHAUSER¹¹⁵⁻¹¹⁶ eine bahnbrechende Idee. Indem man die Elektronenspins in festem Metall in Sättigung hält, können hyperfein gekoppelte Kerne die thermische Spinpolarisation der Elektronen annehmen, die damit ihr NMR-Signal um das ~1.000-fache verstärken. CARVER & SLICHTER¹¹⁷⁻¹¹⁸ gelang es wenig später ein erhöhtes ⁷Li-NMR-Signal in einem ersten DNP-Experiment zu messen. Nach einer langen Phase, in der im Bereich der DNP nur wenige Entwicklungen zu beobachten waren, gelang es dann in den 1990er Jahren durch die Pionierarbeiten von Griffin und Mitarbeitern die DNP-NMR auch für den Hochfeld-NMR-Bereich nutzbar zu machen, was die Entwicklung leistungsfähiger Mikrowellenquellen für den Bereich oberhalb von 100 GHz bis zu wenigen THz erforderlich machte.^{80, 119-121}

Mit der Kommerzialisierung dieser Systeme in den 2000er Jahren konnte das Anwendungsfeld, insbesondere durch die Arbeiten von LESAGE und EMSLEY deutlich erweitert werden.⁷⁷ Die DNP-NMR ist mittlerweile in der Materialwissenschaft und Biochemie von besonderem Forschungsinteresse basierend auf der Möglichkeit auch substanzielle Kernhyperpolarisation bei großen magnetischen Feldern unter MAS-Bedingungen zu erzeugen. Da DNP eine gleichzeitige ESR- und NMR-Anregung erfordert, steigert sich die Komplexität der Instrumente und Experimente. Zudem erfordert sie gemeinsame Anstrengung, die Bereiche ESR und NMR effektiv näher zusammenzubringen, nachdem diese über mehrere Jahrzehnte als getrennte Techniken betrachtet wurden. Darüber hinaus hat die Technik durch die Entwicklung neuartiger polarisierender Agenzien¹²²⁻¹²⁷ die Aufmerksamkeit der Radikalchemie auf sich gezogen, was DNP zu einem interdisziplinären Forschungsfeld macht.

Die Hyperpolarisation der DNP-NMR beruht hierbei darauf die größere Polarisation von Elektronenspins auf Kernspins durch Sättigung der Elektronenspinresonanz-Übergänge, unter Verwendung von Mikrowellenbestrahlung zu übertragen. In der Theorie kann somit ein DNP-Verstärkungsfaktor, ϵ , gleich dem Verhältnis zwischen gyromagnetischem Verhältnis des Elektronenspins, S , und des Kernspins, I , erhalten werden.

$$\epsilon_{\max} = \frac{P_S}{P_I} \left(\approx \frac{\gamma_S}{\gamma_I} \text{ für } \gamma \hbar B_0 \ll k_B T \right) \quad (3)$$

Dieser Faktor beträgt 660 für ¹H und ist dementsprechend größer für Kerne mit kleineren gyromagnetischen Verhältnissen. In letzter Zeit wurden verschiedene Experimente und

theoretische Studien durchgeführt, welche den Verstärkungsfaktor der DNP in Richtung des theoretischen Maximums erhöht haben.¹²⁸⁻¹³⁴ Durch diese Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses ergibt der Verstärkungsfaktor, ε , eine Zeitersparnis näherungsweise gleich ε^2 .

Für die meisten Untersuchungen der DNP-Anwendungen ist es notwendig diamagnetische Proben mit paramagnetischen Zentren als Polarisationsquelle zu verwenden. Normalerweise dienen hierfür stabile Radikale als Polarisationsagentien.

Reine ESR- oder NMR-Übergänge werden durch Auswahlregeln für erlaubte Einzelquanten-Übergänge unterschieden, d. h. $m_S = \pm 1$ und $m_I = 0$ für ESR oder $m_S = 0$ und $m_I = \pm 1$ für NMR, wobei S und I die Elektronen- und Kernspin-Quantenzahlen bezeichnen und m_S und m_I die jeweiligen magnetischen Spin-Quantenzahlen. Die DNP beruht jedoch auf gegenseitigen Spin-Flips eines Elektronenspins und eines Kernspins. Solche Multispin-Übergänge werden durch die Hyperfein-Wechselwirkung vermittelt, was zu einer bevorzugten Anreicherung eines kernmagnetischen Spinzustands gegenüber dem anderen führt. Somit ist es theoretisch möglich, die Elektronenpolarisation quantitativ auf einen Kernspin zu übertragen. In der Praxis erhält man jedoch einen DNP-Verstärkungsfaktor, ε , der typischerweise kleiner ist als das theoretische Maximum, das durch $\varepsilon_{\max} = \gamma_S/\gamma_I$ definiert ist, wobei γ_S und γ_I die gyromagnetischen Verhältnisse des Elektronen- bzw. Kernspins sind. Die μw -Bestrahlung treibt entweder die gegenseitigen Spinflips kohärent an oder sättigt den Elektronen-Einzelquanten-Übergang, was eine inkohärente Elektron-Kern-Kreuzrelaxation ermöglicht. Gleichzeitig strebt die Longitudinalmagnetisierung der Kernspins über die Spin-Gitter-Relaxation ins thermische Gleichgewicht zurück, was die DNP-Effizienz begrenzt. Weiterhin kann die Kernspinpolarisation über Spindiffusion zwischen Kernen desselben Typs ausgetauscht werden, was besonders effizient für ^1H Spins funktioniert. Dieses Zusammenspiel verschiedener Wechselwirkungen in einem Multispin-System birgt eine Vielzahl möglicher Übertragungswege zwischen dem Elektronenspin von Polarisationsagentien und den zu detektierenden Kernspins die parallel auftreten können und zum Beispiel durch die Wahl der NMR-Pulsfolge selektiv gesteuert werden können. Ein wichtiger Punkt ist, dass Spindiffusion die verstärkte Polarisation über mehrere Nanometer vom paramagnetischen Zentrum transportieren kann,⁸⁷ was den Nachweis von Kernspins mit unbedeutendem Hyperfein-Wechselwirkungs-Beitrag ermöglicht und Effekte wie paramagnetische Verschiebungen oder Verbreiterungen vermeidet.⁷

Bei hohen Magnetfeldern ist der Zeeman-Effekt typischerweise die dominante Wechselwirkung für jeden Spin, der an DNP beteiligt ist. In der Pseudo-Hochfeld-Näherung können jedoch sogenannte verbotene Übergänge, die Änderungen der beiden magnetischen Spinquantenzahlen erfordern, durch kohärente μw -Felder oder inkohärente lokale

Feldfluktuationen ineffizient angeregt werden. μ w-Felder werden meist in einer CW-Weise angewandt und adressieren relativ langsame Transfermechanismen wie den *solid effect* (SE)¹³⁵⁻¹³⁶, den *cross effect* (CE)¹³⁷⁻¹³⁹ und den OVERHAUSER-Effekt (OE)^{115, 117-118}. Bei diesen Mechanismen ermöglicht die Tatsache, dass die Kernspin-Relaxation langsamer ist als der DNP-Transfer, die Akkumulation einer Kern-Hyperpolarisation mit effektiven DNP-Aufbauzeitkonstanten in der Größenordnung der Kernspin-Gitter-Relaxationszeitkonstanten. Im Gegensatz bekommen gepulsten DNP-Techniken in letzter Zeit größere Aufmerksamkeit,¹⁴⁰ da sie sehr viel größere Transferraten ermöglichen. Allerdings bedürfen gepulste DNP-Techniken einem erhöhten instrumentellen Aufwand und das verwendete Equipment ist bisher nicht kommerziell erhältlich.

Der OE ist der am längsten bekannte DNP-Mechanismus und beruht rein auf inkohärentem Transfer durch Kreuzrelaxation. Um unterstützende Bedingungen für die OE-DNP zu erreichen, muss die Hyperfein-Wechselwirkung zeitabhängig und stochastisch sein, was entweder in festen Systemen mit mobilen Elektronen wie Metallen oder in Lösungen mit ungepaarten Elektronen möglich ist.^{95, 116, 141}

Der SE ist der erste bekannte DNP-Mechanismus, der in dielektrischen Festkörpern beobachtet wurde. Er wurde unabhängig voneinander von drei Gruppen unter der Leitung von JEFFRIES,¹³⁵⁻¹³⁶ ABRAGAM¹⁴² und UEBERSFELD¹⁴³ entdeckt. In den folgenden Jahrzehnten wurde der SE zu einem universell angewandten DNP-Mechanismus, da er zwischen einem einzelnen Elektronenspin und einem *hyperfine* gekoppelten Kern wirken kann. Diese Eigenschaft macht den SE sehr nützlich, wenn andere, potenziell effizientere DNP-Mechanismen wie der CE nicht vorhanden sind. Zum Beispiel, wenn ein Monoradikal oder Metallion in einem bestimmten Konzentrationsbereich als Polarisationsagens verwendet wird.^{8, 144-148}

Der CE ist derzeit der effizienteste CW-DNP-Mechanismus in rotierenden Festkörpern und tritt in Drei-Spin-Systemen auf, die aus zwei Elektronenspins und einem Kernspin bestehen. Er erfordert eine pseudosekulare Hyperfein-Wechselwirkung in Kombination mit einer relativ großen inhomogenen Verbreiterung der ESR-Linie in der Größenordnung von mindestens der Kern-Larmor-Frequenz sowie ausreichend starke Elektron-Elektron-Wechselwirkungen. Der CE wurde erstmals von KESSENIKH *et al.*^{137-138, 149} sowie HWANG und HILL¹³⁹ auf der Basis von intermolekularen Elektron-Elektron-Kopplungen in dotierten Polymeren unter statischen NMR-Bedingungen experimentell beobachtet und theoretisch beschrieben. Unter den untersuchten Bedingungen bei sehr niedrigen Temperaturen ($\leq 4,2$ K) unterliegt die ESR-Linie jedoch einer starken spektralen Diffusion, daher sind bei DNP alle Elektronenspins beteiligt und der zugrundeliegende Mechanismus lässt sich möglicherweise besser durch thermisches Mischen beschreiben.¹⁵⁰ Später erklärten ATSARKIN *et al.*¹⁵¹ den CE mit der ESR-Linienform,

die durch die Null-Feld-Aufspaltung von Cr^{3+} in Rubin verursacht wird. Die erste Beschreibung des CE mit zwei ESR-Linien, die durch die Kern-Larmor-Frequenz getrennt sind (die Grundlage für die moderne Behandlung dieses Mechanismus), wurde von WOLLAN¹⁵²⁻¹⁵³ im Jahr 1976 veröffentlicht.

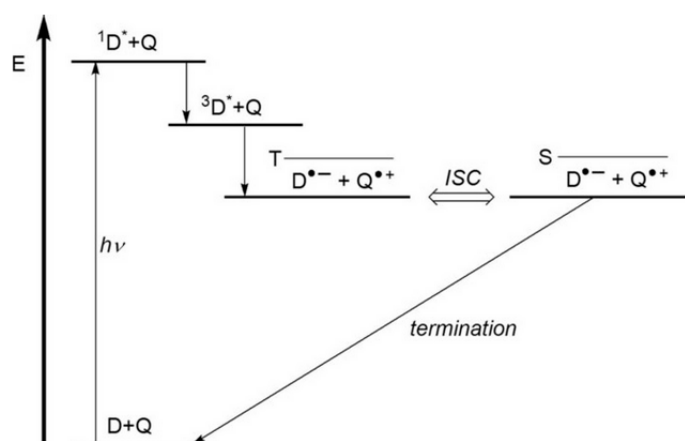
3.4.2. Chemisch induzierte, dynamische Kernpolarisation

Die chemisch induzierte, dynamische Kernpolarisation (*chemically induced dynamic nuclear polarisation*, CIDNP) nutzt chemische Reaktionen zur Sortierung von Kernspinzuständen, was zu einer Anreicherung oder Verarmung bestimmter Zustände führt, die in der Spin-Hyperpolarisation von Reaktionsprodukten resultiert. Eine solche Spinsortierung wird bei chemischen Reaktionen mit Radikalpaaren als Zwischenprodukten durchgeführt. Typischerweise werden Radikalpaare durch Lichtbestrahlung oder thermisch erzeugt.¹⁰⁻¹¹ Die Analyse von CIDNP bietet eine Methode zur Untersuchung von kurzlebigen Radikalpaaren in Lösungen bei Umgebungstemperatur, wobei diese Radikalpaare oft außerhalb der Reichweite herkömmlicher ESR-Techniken liegen.^{10-11, 154-156}

CIDNP ist ein nützliches Werkzeug, um biologisch wichtige Moleküle zu untersuchen. Wie von KAPTEIN *et al.*¹⁵⁷ vorgeschlagen, wird CIDNP in Proteinmolekülen durch chemische Reaktionen zwischen einem angeregten Farbstoffmolekül (Photosensibilisator) und CIDNP aktiven Aminosäureresten erzeugt. Hier handelt es sich um Histidin, Tyrosin, Tryptophan und Methionin, welche sich auf der Oberfläche eines Proteins befinden. Dadurch kann eine hyperpolarisierte Sonde auf der Proteinoberfläche erzeugt werden, die zur Untersuchung der Molekulardynamik verwendet werden kann. Darüber hinaus kann CIDNP genutzt werden, um schnelle Reaktionen von Radikalen und Radikalpaaren zu untersuchen, wie z. B. inter- und intramolekularen Elektronentransfer und Wege der DNA-Reparatur.

Der Spin-Sortier-Mechanismus von CIDNP ist der Hauptmechanismus, der in flüssigen Lösungen bei hohen B_0 Feldern wirkt. Die Idee der Spinsortierung, die auf dem Radikalpaar-Mechanismus (*radical pair mechanism*, RPM) basiert, der unabhängig voneinander von CLOSS¹⁵⁸ sowie KAPTEIN und OOSTERHOFF^{12, 159} vorgeschlagen wurde, wird im Folgenden erläutert. Der RPM ist das Schlüsselkonzept im CIDNP und in der Spin-Chemie, der sich mit den Auswirkungen von Magnetfeldern auf chemische Reaktionen mit Radikalpaar-Zwischenprodukten beschäftigt.^{15, 160-163}

In Schema 3-1 ist der Prozess, der zur Erzeugung von CIDNP führt, dargestellt.



Schema 3-1: Allgemeine Darstellung einer zyklischen photochemischen Reaktion zwischen Farbstoff (D) und Quencher (Q), bei der CIDNP erzeugt werden kann. Nach Photoanregung und Interkonversion mit anschließendem Elektronentransfer wird aus dem Triplett-Vorläufer ($^3D^*$) ein Radikalpaar im Triplett-Zustand gebildet. Die *Inter-System-Crossing* (ISC)-induzierten Triplett-Singulett-Übergänge im Radikalpaar; rekombinieren das Singulett-Radikalpaar in den Grundzustand (*termination*). Die CIDNP-Bildung wird durch die Abhängigkeit der Interkonversionsrate vom Kernspinzustand des Radikalpaares verursacht. Daher ist das Reaktionsprodukt in bestimmten Kernspinzuständen angereichert.¹³

Hier wird nach Lichtanregung eines Farbstoffmoleküls, D, zum angeregten Singulett-Zustand $[D \rightarrow ^1D^*]$, durch Inter-System-Crossing (ISC) in einen angeregten Triplettzustand $^1D^* \rightarrow ^3D^*$ und Elektronentransfer von einem Quencher-Molekül, Q, ein Radikalpaar $[D^{\bullet-}Q^{\bullet+}]$ gebildet. Da der Elektronenspin bei chemischen Reaktionen in der Regel erhalten bleibt, wird das Radikalpaar (RP) $[D^{\bullet-}Q^{\bullet+}]$ im gleichen Spin-Zustand wie $^3D^*$ und Q als Triplett gebildet. In den meisten Fällen rekombinieren Singulett- und Triplett-Radikalpaare mit unterschiedlichen Raten. Üblicherweise ist die Rekombination im Singulett-Zustand schneller. Daher ist für die Rekombination die Singulett-Triplett-Interkonversion erforderlich. Wenn für einen bestimmten Kernspin-Zustand die Interkonversion schneller ist, rekombiniert das RP in diesem Zustand schneller, mit der Folge, dass die Reaktionsprodukte in diesem Zustand angereichert sind. Wenn für einen anderen Zustand die Interkonversion langsamer ist, rekombiniert das Radikalpaar auch langsamer und das Reaktionsprodukt ist in diesem Zustand verarmt. Folglich unterscheiden sich die Populationen der Kernspinzustände des Reaktionsprodukts von denen bei Gleichgewichtsbedingungen, was zu einer CIDNP-Hyperpolarisation des Spins führt. Die chemische Reaktion sortiert also die Kernspinzustände in Bezug auf die Konversionsrate im RP in den entsprechenden Zuständen.¹³

Die biologische Anwendung der CIDNP-Methode ermöglicht es einige der natürlichen Aminosäuren zu polarisieren: Tryptophan (Trp), Tyrosin (Tyr), Histidin (His)¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ und Methionin (Met),¹⁶⁷ Glycin (Gly),¹⁶⁸ und Methylcystein¹⁶⁹ sowie alle DNA- (RNA-) Komponenten, wie Guanosin und Adenosin und deren Monophosphate,¹⁷⁰⁻¹⁷⁵ Thymin,¹⁷⁶ Cytidin und Uridin-Monophosphate.¹⁷⁷ Als Photosensibilisatoren, die zur Initiierung einer

CIDNP-auslösenden Photoreaktion verwendet werden, kommen verschiedene Farbstoffe zum Einsatz. Diese Farbstoffe sind 2,2-Dipyridyl (DP),¹⁶⁵⁻¹⁶⁶ 4-Carboxybenzophenon (4-CBP),^{167, 169, 178-179} 3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon (TCBP),^{174, 180} und Flavine mit verschiedenen Substituenten.^{164, 170, 172, 181} Für die Durchführung von Experimenten unter speziellen Bedingungen, wie z. B. bei sehr niedrigen Konzentrationen, kann man auch andere Farbstoffe, wie z. B. Fluorescein, verwenden.¹⁸² Nach Photoanregung durch einen kurzen Laserpuls gehen diese Farbstoffe in den angeregten Triplett-Zustand über, anschließend kommt es durch Elektronentransfer oder H-Transfer zur Bildung eines Radikalpaares im Triplett-Zustand. Dieses Radikalpaar besteht aus dem Radikal eines Farbstoffs und dem Radikal des untersuchten Biomoleküls. Die CIDNP, die bei der Rekombination des primären, spin-korrelierten Radikalpaares entsteht, kann durch den Nachweis der Polarisierung nach dem Laserpuls analysiert werden. Die nachfolgende, zeitliche Entwicklung der Polarisierung aufgrund von Prozessen, die in freien Paaren auftreten, wird durch Variation der Verzögerung τ auf der Mikrosekunden-Zeitskala untersucht.

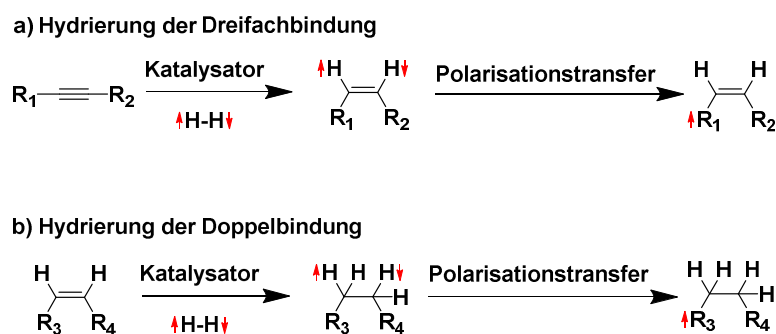
Mit den gleichen Farbstoffen als Photosensibilisatoren kann man auch komplexere Biomoleküle, wie Peptide und Proteine, polarisieren. In diesem Fall können CIDNP-aktive Aminosäurereste (Trp, Tyr, His und Met) polarisiert werden, wenn sie für das Farbstoffmolekül zugänglich sind. Auf diese Weise wird CIDNP verwendet, um die Zugänglichkeit dieser auf der Proteinoberfläche befindlichen Reste zu untersuchen.^{156 157}

3.4.3. Parawasserstoff-induzierte Polarisation

Weitere Hyperpolarisationsmethoden stellen die Parawasserstoff-basierten Techniken, wie Signalverstärkung durch reversiblen Austausch (*signal amplification by reversible exchange*, SABRE) und Parawasserstoff-induzierte Polarisation (*parahydrogen induced polarisation*, PHIP) dar. Seit den Pionierarbeiten von BOWERS, WEITEKAMP¹⁸³⁻¹⁸⁴ und EISENSCHMID *et al.*¹⁸⁵ haben sich zahlreiche Anwendungen in der Katalyse, analytischen Chemie und Biomedizin etabliert.¹⁸⁶⁻¹⁸⁷ Der Vorteil von PHIP-Anwendungen sind die schnelle und kostengünstige Herstellung von hyperpolarisierten Spezies und die unter günstigen Umständen sehr hohen erzielbaren Polarisierungen. Ihr Hauptnachteil ist die Notwendigkeit eines Katalysators für die notwendige reversible oder irreversible Hydrierreaktion. Insbesondere für medizinische *in-vivo*-Experimente ist die schnelle Trennung von Katalysator und hyperpolarisiertem Agens essentiell und stellt eine große Herausforderung dar.^{186, 188} Aufgrund neuerer Fortschritte wird PHIP zunehmend zu einer Methode der Wahl für die Polarisierung vieler Moleküle bei geringen Kosten für den apparativen Aufbau und hohem Durchsatz. Die Hyperpolarisation

von Aminosäuren mit PHIP ist von besonderem Interesse für die Biochemie und die MRT-Bildgebung.¹⁶

PHIP basiert auf der Spinordnung von p-H₂. Es gibt verschiedene Varianten, aber die meisten zeichnen sich durch zwei wesentliche Schritte aus: Das Hinzufügen von Spin-Ordnung zu einem Zielmolekül und die Umwandlung dieser Ordnung in beobachtbare Polarisation (Schema 3-2).



Schema 3-2: Allgemeine Darstellung von Parawasserstoff-basierter Hyperpolarisation mit Polarisationstransfer durch die grundlegenden Reaktionen der Hydrierung einer Dreifachbindung a) und einer Doppelbindung b).

Para-H₂ ist eine geeignete Quelle für Spin-Ordnung, da es schnell in großen Mengen hergestellt werden kann und eine lange Lebensdauer hat. Bestehend aus zwei Protonen (Spin- $\frac{1}{2}$ -Teilchen), folgt molekularer, zwei-atomiger Wasserstoff dem Pauli-Prinzip. Daher muss die Gesamtwellenfunktion das Vorzeichen wechseln, wenn die Protonen vertauscht werden. Das Ergebnis sind zwei Spin-Isomere, Parawasserstoff (p-H₂) und Orthowasserstoff (o-H₂). Für p-H₂ ist die Kernspin-Wellenfunktion antisymmetrisch ($S=0$) und die Wellenfunktion der Rotationszustände symmetrisch. Die Rotationsquantenzahl ist also gerade: $J=2n$. Ortho-H₂ dagegen hat einen symmetrischen Kernspinzustand ($S=1$) und antisymmetrische Rotationszustände ($J=2n+1$). Aufgrund der Entartung der Spinzustände ($g=2S+1$) gibt es einen antisymmetrischen (Singulett, para) Kernspinzustand und drei symmetrische Kernspinzustände (Triplett, ortho). Die Energiedifferenz zwischen den Grundrotationszuständen $J=0$ und $J=1$ ist viel kleiner als die thermische Energie bei Raumtemperatur, ca. 120 cm^{-1} ,¹⁸⁹ sodass das Verhältnis [o-H₂]:[p-H₂] hier 3:1 beträgt. Bei 77 K liegt das Verhältnis bereits nahe bei 1:1, während es bei 25 K 1:99 beträgt. Da der Übergang o-H₂→p-H₂ kinetisch gehemmt ist, wird ein Umwandlungskatalysator wie Aktivkohle oder FeO(OH) verwendet, um eine Anreicherung von p-H₂ bei niedrigen Temperaturen zu erreichen. Einmal hergestellt, kann der erzeugte p-H₂ in Abwesenheit der Katalysatoren bequem in Flaschen bei RT gelagert und bei Bedarf in Experimenten verwendet werden.¹⁶

3.5. Festphasen-Peptidsynthese

Die heutige chemische Peptidsynthese folgt der Strategie der Festphasenpeptidsynthese (engl. *solid phase peptide synthesis* (SPPS)) nach MERRYFIELD, welche mit der Fmoc/*tert*-Butyl-Strategie nach SHEPPARD optimiert wurde.³²

Der Aufbau des Peptids erfolgt vom C- zum N-Terminus, während die Schreibweise des Peptides umgekehrt zum Aufbauprinzip ist. Die Basis für die Kopplung bildet ein polymeres Trägerharz als feste Phase, das häufig aus Polystyrol und seinen Derivaten besteht. Das Harz wird mit der ersten Aminosäure über einen Linker verbunden, wobei der Linker später als Spaltstelle des fertigen Peptides vom Harz dient (siehe Abbildung 3-3).

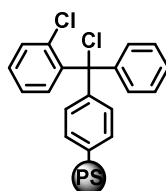
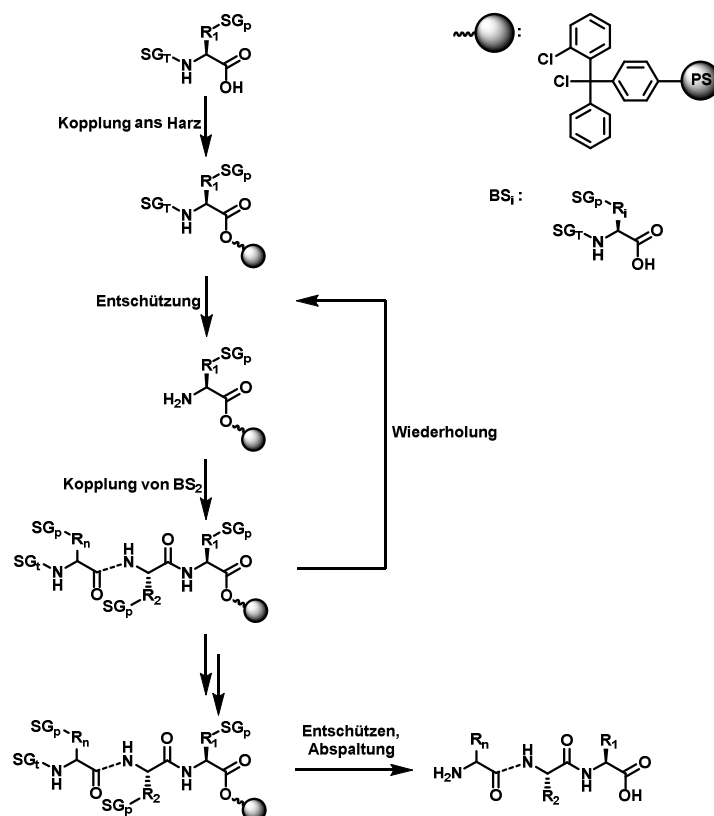


Abbildung 3-3: Darstellung der Funktionalitätsstruktur auf dem Trägermaterial Polystyrol (PS) des 2-Chlorotryl-Harzes.

Hierbei ist die Seitenkette der Aminosäurebausteine (BS_i) mit einer permanenten Schutzgruppe (SG_p), wie eine *tert*-Butyl- oder Trityl-Schutzgruppe, und der N-Terminus mit der temporären Schutzgruppe (SG_t) Fmoc (Fluorenylmethoxycarbonyl), geschützt.¹⁹⁰ Hierbei folgen die permanenten und temporären Schutzgruppen einer orthogonalen Schutzungsstrategie, damit die Seitenketten der Aminosäurebausteine bis zur Abspaltung vom Harz geschützt bleiben und der N-Terminus separat für Kopplungsreaktionen entschützt werden kann. Jeder Aminosäurebaustein wird nach dem gleichen Schema gekoppelt: Nach der Kopplung des C-Terminus des ersten Bausteins (BS_1) an das Harz wird dieser entschützt bzw. die temporäre Schutzgruppe Fmoc am N-Terminus entfernt. Anschließend wird der nächste Aminosäurebaustein (BS_2) gekoppelt.

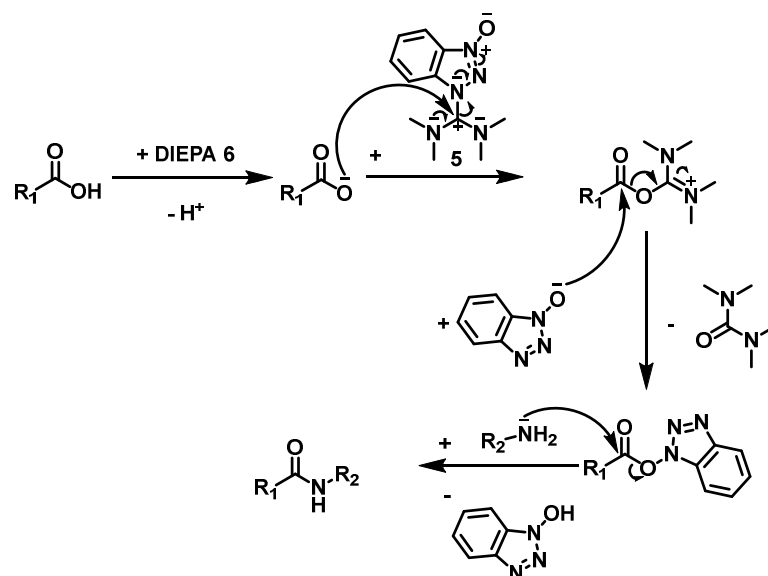
Nach der Kopplung des letzten Bausteins werden die Seitenketten entschützt und das Peptid vom Harz abgespalten. Ein allgemeine Darstellung der Festphasen-Peptidsynthese ist in Schema 3-3 gezeigt.¹⁹¹



Schema 3-3: Allgemeiner Reaktionsverlauf einer SPPS.

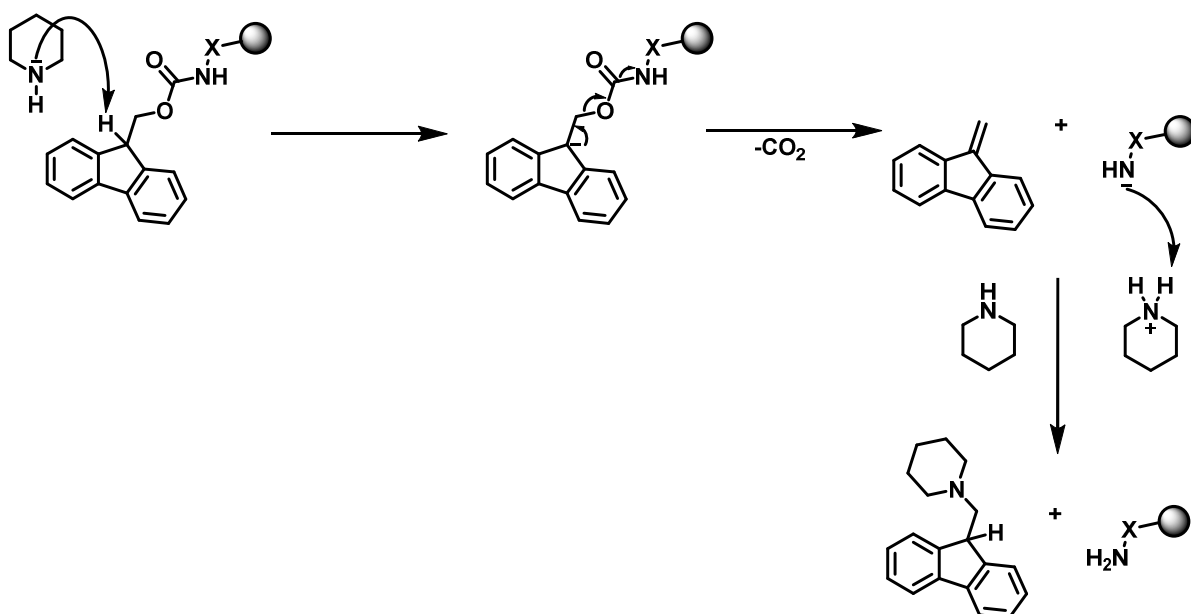
Da die Fmoc-Aminosäurederivate weit verbreitet sind, ist die Peptidsynthese mit dieser Strategie besonders kostengünstig und erfordert nicht den Einsatz von toxischem Fluorwasserstoff im Vergleich zur klassischen Boc-Strategie nach MERRIFIELD.^{31, 192} Das Harz und die permanenten Schutzgruppen an den Seitenketten benötigen zur Abspaltung des Peptids saure Bedingungen, sodass für den N-Terminus eine basisch labile Schutzgruppe gewählt wird.

Das Wachstum der Peptidkette erfolgt durch Bildung eines Aktivesters zum Beispiel durch HATU **5** (*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat). Zunächst wird die zu koppelnde Aminosäure von der Base DIPEA **6** (*N,N*-Diisopropylethylamine) deprotoniert und das resultierende Anion greift nukleophil das Benzotriazol-Derivat an. Infolgedessen wandelt sich das reaktive Intermediat in den zugehörigen aktiven Ester um, damit im Anschluss die Bildung der Peptidbindung mit der freien Aminogruppe der am Harz gebundenen Aminosäure entsteht (siehe Schema 3-4).



Schema 3-4: Ein allgemeines Schema der HATU-vermittelten Bildung eines Aktivesters zum Wachstum einer Peptidkette der SPPS.

Hierbei ist die Ausbeute abhängig von der Effizienz jedes einzelnen Kopplungsschrittes. Diese Kopplungseffizienz kann durch Konzentrationsbestimmung des Fmoc-Piperidin-Addukts, das bei der Entschützung des N-Terminus der gebundenen Aminosäurebausteine gebildet wird, mittels UV-Vis-Analytik ermittelt werden. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppe während der Synthese erfolgt üblicherweise unter schwach basischen Bedingungen, in 20 % Piperidin in DMF. Der in Reaktionsmechanismus der Fmoc-Abspaltung von der festen Phase ist in Schema 3-5 dargestellt.



Schema 3-5: Mechanismus der Entfernung der Fmoc-Gruppe vom festen Träger und Bildung des Dibenzofulvene-Piperidin-Addukts in Gegenwart von Piperidin.

Der erste Reaktionsschritt basiert auf einer β -Eliminierung.¹⁹³ Zunächst wird das Proton aus der Fluorenylgruppe an der Position 9 durch Piperidin unter Bildung von Dibenzofulven entfernt. Im nächsten Schritt führt die Anwesenheit von Piperidin zur Bildung von Dibenzofulven-Piperidin-Addukten auf der Basis der Addition vom Michael-Typ.¹⁹⁴ Diese Reaktion findet in der Regel in elektronenspendenden polaren Lösungsmitteln wie DMF statt. Die Reaktion von Fmoc-geschützter Kernschale und Piperidin führt zur Bildung des Piperidin-Dibenzofulven-Addukts. Da dieses Addukt in den Reaktionslösungsmitteln löslich ist, kann die photometrische Messung zur Bestimmung der Konzentration der Fmoc-Gruppen auf der Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes verwendet werden. Die Bestimmung der Fmoc-Gruppen des Harzes ermöglicht die Berechnung der Beladung durch Fmoc-Aminosäurebausteine für jeden Kopplungsschritt. Die photometrischen Messungen ergeben zwei Absorptionsmaxima, bei 289 und 301 nm, was auf das Vorhandensein des Dibenzofulven-Piperidin-Addukts in der Lösung schließen lässt. Der molare Absorptionskoeffizient kann mittels linearer Regression durch bekannte Dibenzofulven-Piperidin-Addukt-Konzentrationen bei 301 nm ermittelt werden (siehe Abbildung 3-4).

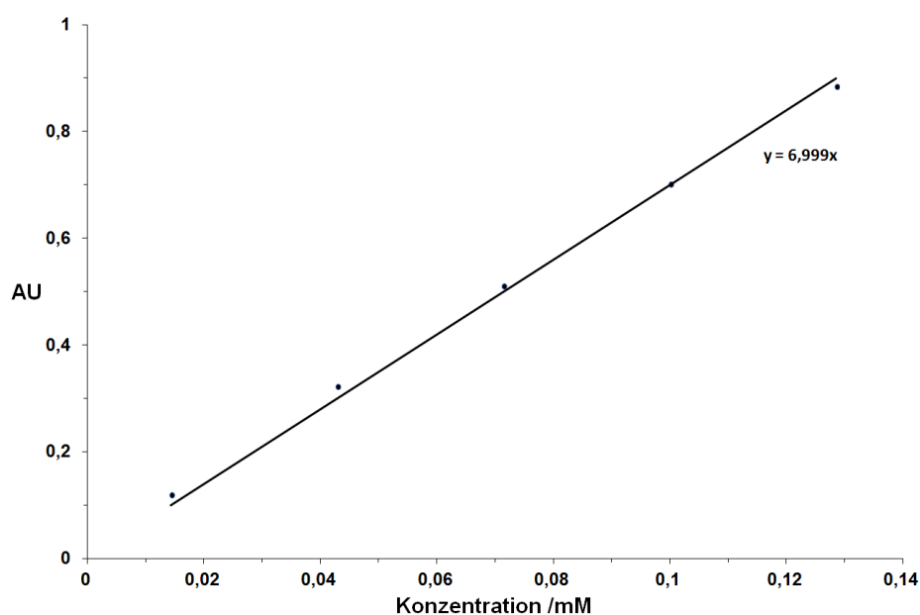


Abbildung 3-4: Darstellung der linearen Regression bekannter Dibenzofulven-Piperidin-Addukt-Konzentrationen bei 301 nm zur Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten.

Aus den experimentellen Daten der UV-Bestimmung ergab sich ein molarer Extinktionskoeffizienten von $6999 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, welcher zur Kontrolle der Beladungen der einzelnen Kopplungsschritte verwendet wurde.

4. Aufgabenstellung

4.1. Markierung von Fmoc-Aminosäuren für Anwendungen in Hyperpolarisationstechniken

Fmoc-Aminosäuren ermöglichen es Peptide chemisch mittels SPPS herzustellen. Der klassische Ansatz sieht hierbei vor, dass der N-Terminus mit der basisch labilen, temporären Schutzgruppe Fmoc geschützt ist, während die Seitenkette mit orthogonalen, Säure-labilen, Schutzgruppen geschützt sind und der freie C-Terminus zur Kopplung gemäß der SPPS zur Verfügung steht. Um nun eine markierte Fmoc-Aminosäure zu erhalten, ist es notwendig den N- und C-Terminus unberührt zu lassen, wodurch das Ziel einer Funktionalisierung auf die Seitenkette fällt (siehe Abbildung 4-1).

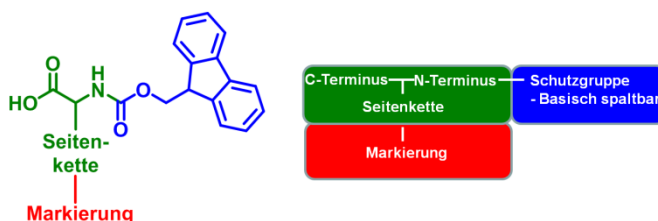
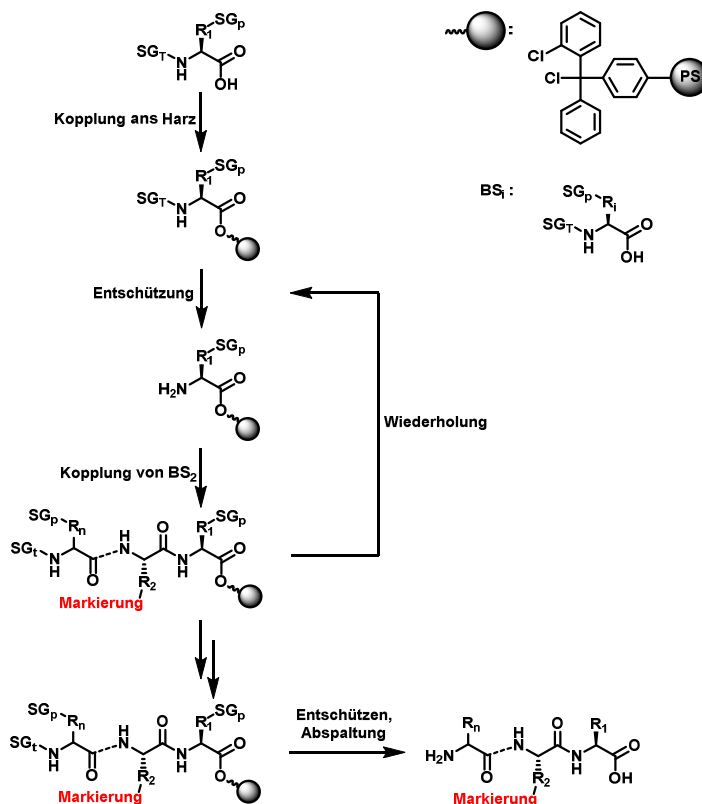


Abbildung 4-1: Allgemeiner Strukturvorschlag eines markierten Fmoc-Aminosäurebausteins zur Verwendung in der SPPS.

Da eine direkte Modifizierung dieser Bausteine durch Konkurrenzreaktionen nicht selektiv möglich ist, werden Aminosäuren benötigt, die am N- und C-Terminus orthogonal zueinander geschützt sind und eine reaktive Seitenkette für die Modifikation besitzen. Um die Seitenketten selektiv modifizieren zu können, muss entweder eine Aminosäure gefunden werden, deren C-terminale Schützung orthogonal zur N-terminalen Schützung ist, oder der C-Terminus einer Fmoc-Aminosäure selektiv orthogonal geschützt werden. Nach der anschließenden Modifikation der Seitenkette ist diese für spätere Reaktionen zugleich geschützt. Die abschließende selektive Entschützung des C-Terminus erzeugt dann eine modifizierte Fmoc-Aminosäure, die als Synthesebaustein für die SPPS geeignet ist. Diese Synthesestrategie soll es ermöglichen markierte Fmoc-Aminosäuren für Anwendungen in Hyperpolarisationstechniken zu generieren.

4.2. Markierte Peptide mittels SPPS

Die hergestellten markierten Fmoc-Aminosäure-Bausteine sollen mittels SPPS in Modell-Peptidsequenzen eingebunden werden (siehe Schema 4-1)



Schema 4-1: Vorschlag eines allgemeinen Reaktionsverlaufs der SPPS mit einer markierten Fmoc-Aminosäure (BS₂).

Hierbei soll validiert werden, ob die funktionalisierten, markierten Fmoc-Aminosäuren erfolgreich in dem SPPS-Syntheseprotokoll verwendet werden können und trotz der Reaktionsbedingungen stabil bleiben. Im Weiteren soll ihr Einbau im Vergleich zu unfunktionalisierten Fmoc-Aminosäuren untersucht werden.

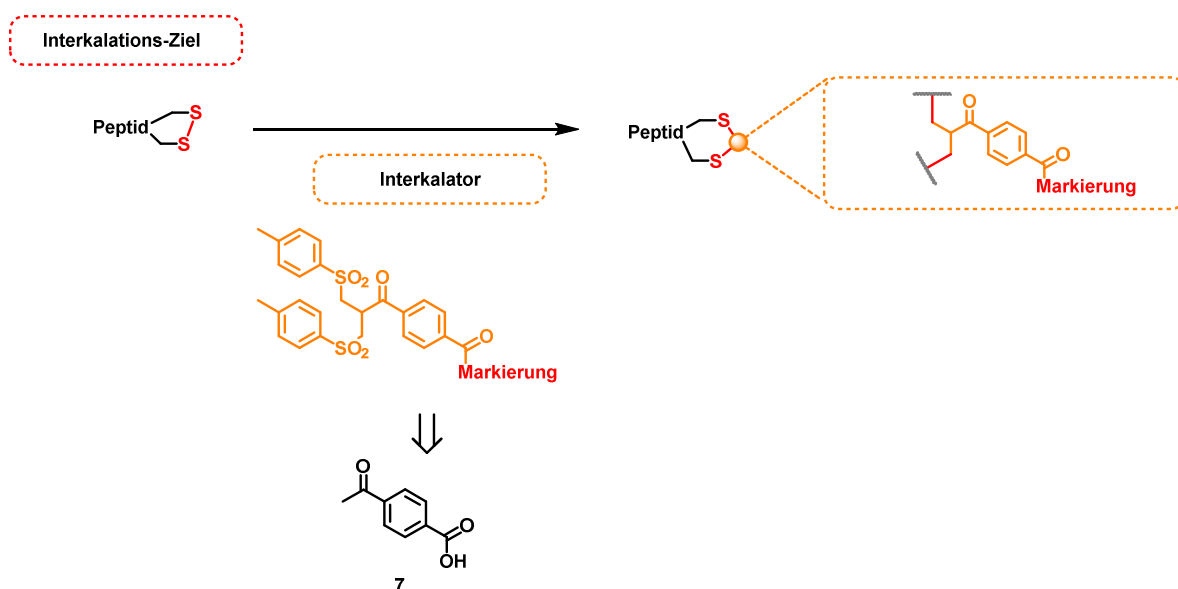
Zusätzlich sollen Biradikalsysteme mit Monoradikal-markierten Fmoc-Aminosäuren hergestellt werden, um mit unterschiedlichen Abständen in einer Modell-Peptidsequenz den Einfluss auf die Signalverstärkung in DNP-Experimenten zu untersuchen.

Auf Basis der literaturbekannten^{164-166, 168} Möglichkeit Aminosäuren wie Tyrosin (Tyr), Histidin (His) und Glycin (Gly) mittels CIDNP zu polarisieren, soll eine weitere Peptidsequenz hergestellt werden, die aus den genannten Aminosäuren sowie einer Benzophenon-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure besteht.

So sollen Untersuchungen bezüglich Polarisationsstudien unterstützt werden und die Vielseitigkeit der Seitenkettenfunktionalisierung von Fmoc-Aminosäuren aufgezeigt werden.

4.3. Markierte Peptide durch Interkalationsreaktion in Disulfidbindungen

Es soll eine spezifische, Bissulfon-basierte Markierungsstrategie analog zur Literatur¹⁹⁵ für bioaktive Moleküle untersucht werden, welche Disulfidbindungen enthalten. Durch die spezifische Radikal- und Allyl-Markierung der Disulfidbindung von Biosystemen sollen bioaktive Moleküle für analytische Techniken wie die ESR und DNP- bzw. PHIP-NMR funktionalisiert werden. Die Markierungen sollen dabei synthetisiert werden und durch Öffnen der Disulfidbrücke eines bioaktiven Peptides mittels Interkalationsreaktion in die Disulfidbindung des Peptides eingebaut werden (siehe Schema 4-2).

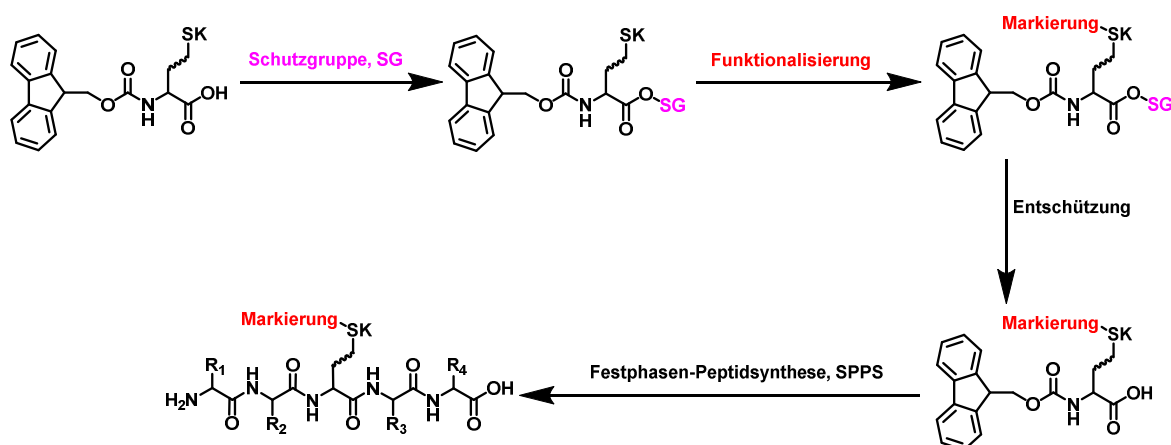


Schema 4-2: Allgemeine Darstellung der Einführung der Bissulfon-basierten Markierung in die reduzierte Disulfidbindung eines Biomoleküls.



5. Funktionalisierung der Seitenkette von Fmoc-Aminosäuren

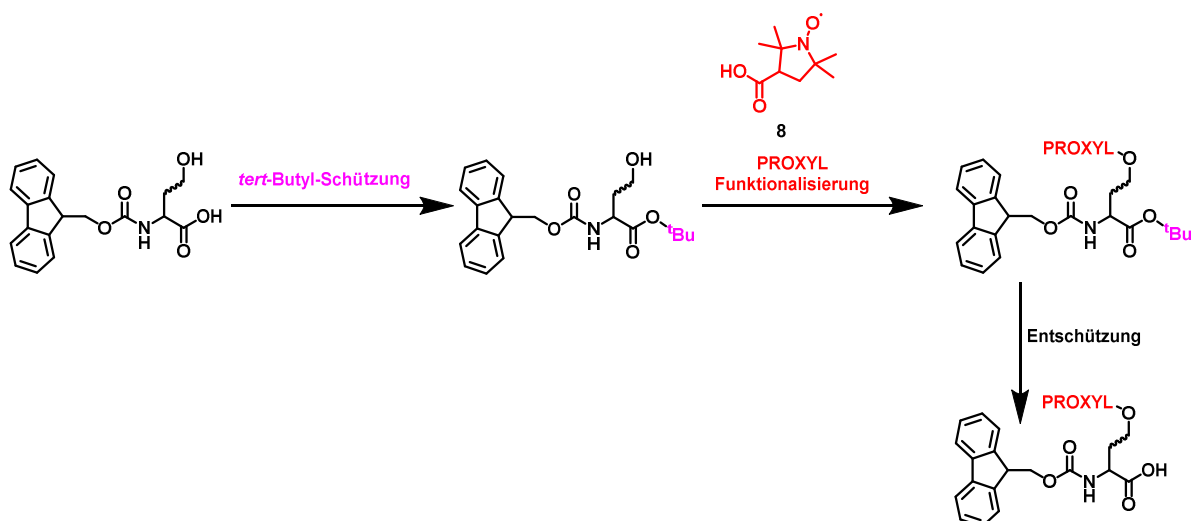
Fmoc-Aminosäurebausteine sind in der Regel zur Verwendung in der SPPS an ihrer reaktiven Seitenkette permanent und an ihrem N-Terminus temporär während des Aufbaus des Peptides geschützt. In dieser Arbeit soll dieses Schema übernommen werden, wobei die permanente Schutzgruppe durch eine Markierung ersetzt werden soll. Eine allgemeine Darstellung dieser Funktionalisierungsstrategie ist in Schema 5-1 dargestellt.



Schema 5-1: Allgemeines Syntheschema Seitenketten-markierter Fmoc-Aminosäuren und ihr Einbau in Peptide mittels Festphasen-Peptidsynthese (SPPS). Dargestellt sind die Reaktionsschritte der C-terminalen Schützung, der Funktionalisierung der Seitenkette (SK) und der C-terminalen Entschützung mit anschließendem Einsatz in der SPPS.

5.1. PROXYL-funktionalisierte Fmoc-Aminosäuren

Die Synthesestrategie von Radikal-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren sieht vor, dass im ersten Schritt der C-Terminus von Fmoc-Aminosäuren mit freier Hydroxy-Seitenkette mit *tert*-Butylgruppen temporär orthogonal zur Fmoc-Schutzgruppe geschützt wird, um dadurch im zweiten Schritt die Möglichkeit zur selektiven Radikal-Seitenkettenfunktionalisierung mittels 3-Carboxy-PROXYL **8** (3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy) zu erreichen. Abschließend wird im dritten Schritt die *tert*-Butyl-Gruppe entfernt und das Produkt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt, um ein möglichst reines Produkt für SPPS-Anwendungen zu erhalten. Eine allgemeine Darstellung dieser Synthesestrategie ist in Schema 5-2 dargestellt.

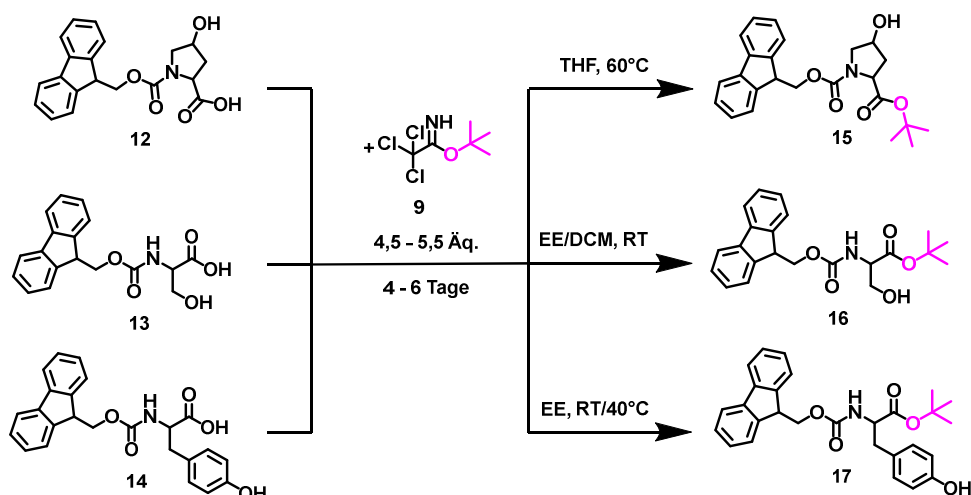


Schema 5-2: Allgemeine Darstellung der Synthese von Radikal-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren. Dargestellt sind die Reaktionsschritte der C-terminalen Schützung, der Funktionalisierung der Seitenkette mit dem Nitroxyl-Radikal 3-Carboxy-PROXYL **8** und der C-terminalen Entschützung.

5.1.1. Herstellung und Charakterisierung von C-terminal *tert*-Butyl-geschützten Fmoc-Aminosäuren

Die *tert*-Butyl-Schützung des C-Terminus von Fmoc-Aminosäuren soll nach THIERRY *et al.*¹⁹⁶ mittels *tert*-Butyl-2,2,2-trichloroacetimidat **9** erreicht werden. In diesem Zusammenhang soll die Synthesestrategie aus vorherigen Arbeiten substituiert werden, um die verwendete, DIC **10** (N,N'-Diisopropylcarbodiimid) aktivierte *tert*-Butanol-Spezies **11** sowie katalytisch verwendetes Cu(I) zu vermeiden. Dadurch sollen die Arbeitsschritte zur Bildung der aktivierten Spezies und die notwendige chromatographische Aufarbeitung aufgrund der Verwendung von Cu(I) entfallen und somit Arbeitszeit und Chemikalieneinsatz minimiert werden.

Diese Synthesestrategie konnte auf Fmoc-Hydroxyprolin **12**, Fmoc-Serin **13** und Fmoc-Tyrosin **14** angewendet werden (siehe Schema 5-3).



Schema 5-3: C-terminale Schützung von Fmoc-Hydroxyprolin **12**, Fmoc-Serin **13** und Fmoc-Tyrosin **14** mittels *tert*-Butyl-2,2,2-trichloroacetimidat **7** mit Reaktionsbedingungen.

Hierbei dient **9** als Reagenz zur Bildung von *tert*-Butylestern an den gegebenen Carboxylfunktionalitäten. Dieses Reagenz reagiert nicht selektiv mit Carboxylgruppen, jedoch erreicht es im Überschuss verwendet bei allen Fmoc-Aminosäuren eine quantitative Umsetzung der Edukte unter Bildung vergleichsweise geringer Mengen an di-*tert*-Butyl-Derivaten.

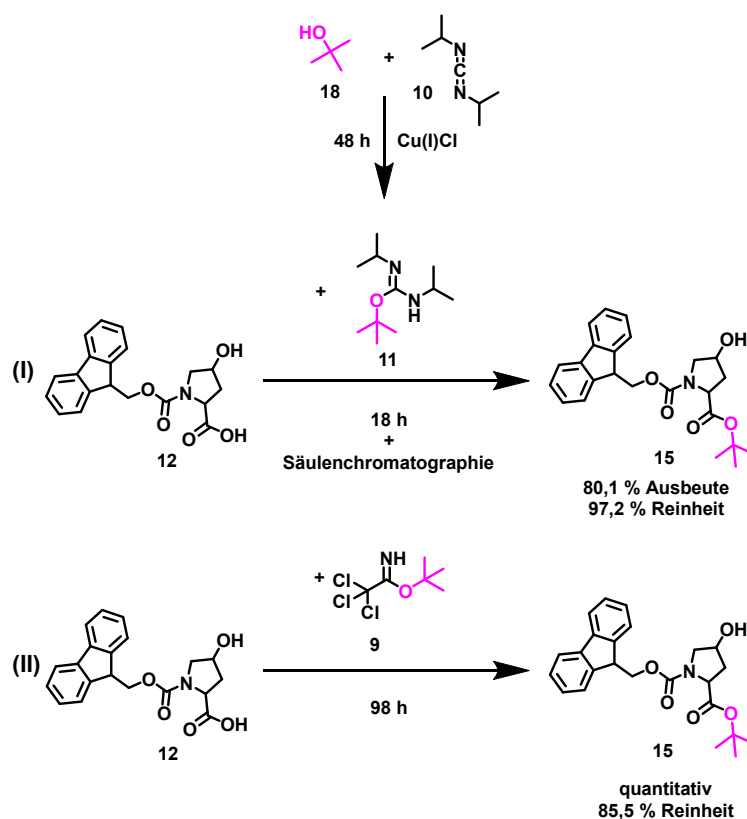
In Tabelle 5-1 sind die mittels HPLC-Analytik (*high performance liquid chromatography*) detektierten Retentionszeiten und die aus der Massenspektrometrie (MS) gewonnenen Daten der hergestellten Produkte und Nebenprodukte aufgelistet.

Tabelle 5-1: Auflistung der detektierten Retentionszeiten mit prozentualem Anteil und MS-Daten der *tert*-Butylgeschützten Fmoc-Aminosäuren und ihrer Nebenprodukte mit der jeweiligen Zuordnung.

Produkt/ Nebenprodukt	t _R [min]	Anteil [%]	Ionisierung	Masse (beobachtet) [m/z]	Masse (berechnet) [m/z]
Fmoc-NH-L-Hyp-O ^t Bu 15 /	6,3	86,6	[M+H] ⁺	410,2	410,2
Fmoc-NH-L-Hyp(O ^t Bu)-O ^t Bu	6,9	13,4	[M+H] ⁺	466,3	466,3
Fmoc-NH-L-Ser-O ^t Bu 16 /	6,2	89,4	[M+H] ⁺	384,2	384,2
Fmoc-NH-L-Ser(O ^t Bu)-O ^t Bu	9,3	10,6	[M+H] ⁺	440,2	440,2
Fmoc-NH-L-Tyr-O ^t Bu 17 /	8,1	87,8	[M+H] ⁺	460,2	460,2
Fmoc-NH-L-Tyr(O ^t Bu)-O ^t Bu	10,8	10,2	[M+H] ⁺	516,3	516,3

Da die gebildeten di-*tert*-Butyl-Derivate in den Folgereaktionen nicht zu Konkurrenzreaktionen führen, können sie vernachlässigt werden, müssen jedoch bei der weiteren

Verwendung in der Einwaage berücksichtigt werden. Die hergestellten Produkte wurden mittels HPLC, MS, ^1H -NMR und ^{13}C -NMR charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.1-12.3). In Schema 5-4 sind die Arbeitsschritte der Schützung aus vorigen Arbeiten ¹⁹⁷ (I) zum Vergleich gegenüber der aktuellen und optimierten Synthese (II) exemplarisch für das Edukt Fmoc-Hydroxyprolin dargestellt.



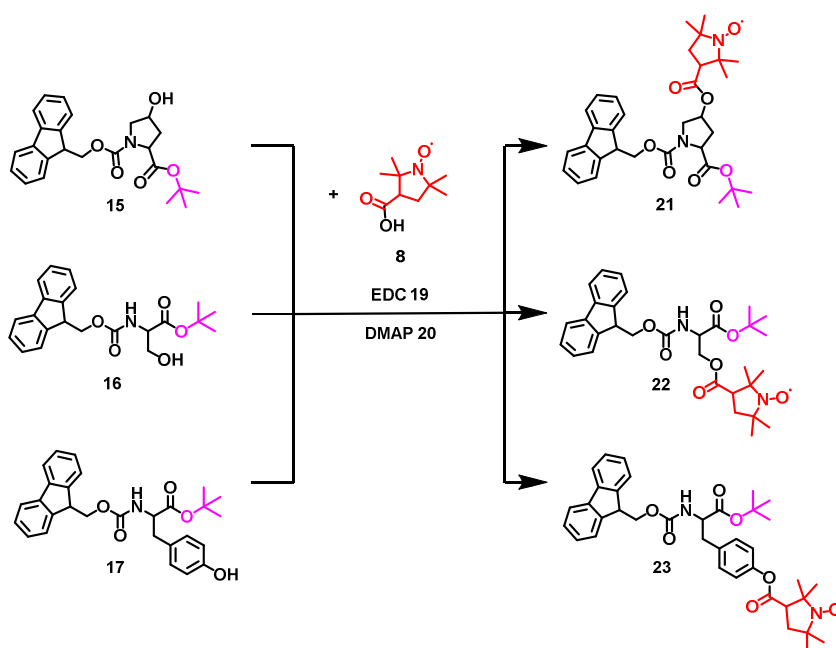
Schema 5-4: Darstellung der Arbeitsschritte der Schützungsreaktion aus vorigen Arbeiten (I) ¹⁹⁷ im Vergleich zu der aktuellen und optimierten Reaktion (II) exemplarisch für das Edukt Fmoc-Hydroxyprolin **12** mit ihren jeweiligen Ausbeuten, Reinheiten und Reaktionszeiten.

Es konnte eine signifikante Verringerung der Arbeitsschritte bei gleichzeitiger Zunahme der Ausbeute erreicht werden. Dabei sank jedoch die Reinheit im gleichen Maße wie die Ausbeute stieg, wodurch die Produktausbeuten von alter (80 %) zu neuer Arbeitsvorschrift (86 %) ähnlich blieben. Die Verunreinigungen der neuen Vorgehensweise sind unerheblich, da diese gebildeten di-*tert*-Butyl-Derivate als doppelt geschützte Nebenprodukte nicht in der anschließenden Funktionalisierungsreaktion mittels 3-Carboxy-PROXYL **8** reagieren. Sie werden nach der letzten Synthesestufe gleichzeitig mit der chromatographischen Aufreinigung zur Entfernung der Nebenprodukte der SPPS entfernt. Dadurch stellt der aktuelle und optimierte Syntheseweg eine Verbesserung dar.

5.1.2. Herstellung und Charakterisierung von PROXYL-funktionalisierten und C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäuren

Die Radikal-Funktionalisierung der Seitenketten der einzelnen C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäuren soll nach IKEDA et al.¹⁹⁸ mittels 3-Carboxyproxyl **8** über eine Veresterung mittels EDC **19** (*N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid) und DMAP **20** (4-(Dimethylamino)pyridin) erreicht werden.

Die Reaktion wurde auf die C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäuren **15**, **16** und **17** angewendet (siehe Schema 5-5).



Schema 5-5: Radikal-Funktionalisierung der reaktiven Hydroxy-Seitenkette der C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäuren **15**, **16** und **17** mit 3-Carboxy-PROXYL **8** mittels EDC **19** und DMAP **20**.

Die Edukte **15**, **16** und **17** wurden der vorangegangenen Synthese entnommen und konnten erfolgreich mit dem Nitroxyl-Radikal 3-Carboxy-PROXYL **8** funktionalisiert werden. Die hergestellten Produkte **21**, **22** und **23** wurden mittels HPLC und MS charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.4-12.6) und die entsprechenden Retentionszeiten und MS-Daten in Tabelle 5-2 aufgelistet.

Tabelle 5-2: Retentionszeiten mit prozentualem Anteil und MS-Daten der mit PROXYL funktionalisierten C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäuren.

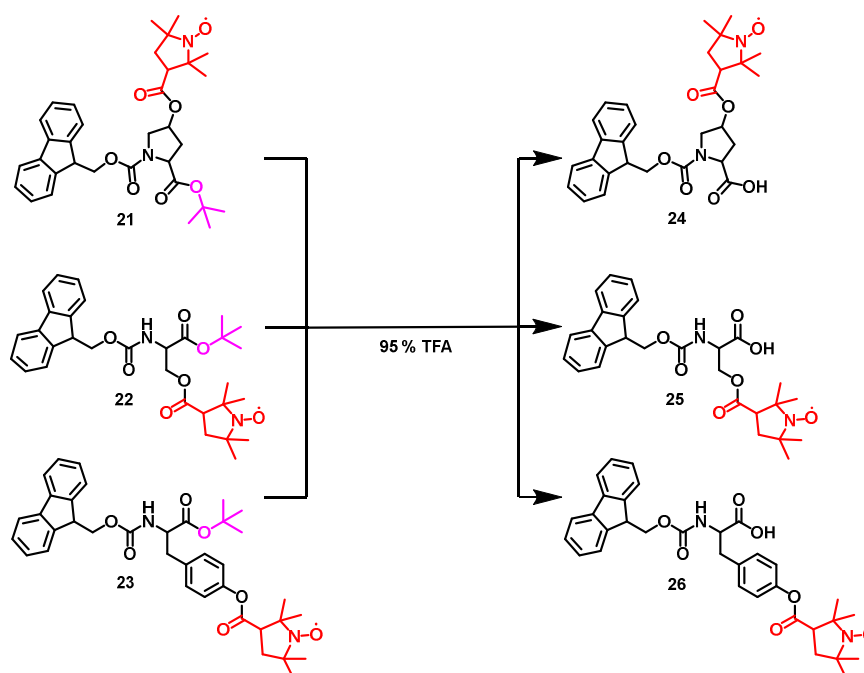
Produkt/ Nebenprodukt	t _R [min]	Anteil [%]	Ionisierung	Masse (beobachtet) [m/z]	Masse (berechnet) [m/z]
Fmoc-Hyp(O-PROXYL)-O ^t Bu 21 /	9,4	84,2	[M] ⁺	577,3	577,3
Fmoc- Hyp(O ^t Bu)-O ^t Bu	10,0	15,8	[M+H] ⁺	466,3	466,3
Fmoc- Ser(O-PROXYL)-O ^t Bu 22 /	9,0	68,2	[M] ⁺	551,3	551,3
Fmoc- Ser(O ^t Bu)-O ^t Bu	10,3	31,8	[M+H] ⁺	440,2	440,2
Fmoc- Tyr(O-PROXYL)-O ^t Bu 23 /	7,8	72,6	[M] ⁺	627,3	627,3
Fmoc- Tyr(^t Bu)-O ^t Bu	9,4	27,4	[M+H] ⁺	516,3	516,3

Die Produkte **21**, **22** und **23** wurden erfolgreich synthetisiert. Des Weiteren konnte eindeutig gezeigt werden, dass die di-*tert*-Butyl-Nebenprodukte der ersten Reaktionsschritte die Radikal-Funktionalisierung nicht beeinflusst und keine weiteren Nebenprodukte gebildet werden.

5.1.3. Herstellung und Charakterisierung von PROXYL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren

Um die Radikal-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren als SPPS-Bausteine zu erhalten, sollen die temporären C-terminalen Schützungen durch die *tert*-Butyl-Gruppen nach KOIVISTO *et al.*¹⁹⁹ mithilfe von 95%iger Trifluoressigsäure entfernt werden.

Die Reaktion wurde auf die C-terminal geschützten und Radikal-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren **21**, **22** und **23** angewendet (siehe Schema 5-6).



Schema 5-6: Entschützung des C-Terminus der PROXYL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren **21**, **22** und **23**.

Die PROXYL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren wurden mittels HPLC und MS charakterisiert (siehe Anhang 12.7-12.9). In Tabelle 5-3 werden die Retentionszeiten und MS-Daten der hergestellten Produkte aufgelistet.

Tabelle 5-3: Retentionszeiten, Reinheiten und MS-Daten der mit PROXYL funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren.

Produkt	t _R [min]	Reinheit [%]	Ionisierung	Masse (beobachtet) [m/z]	Masse (berechnet) [m/z]
Fmoc-Hyp(O-PROXYL)-OH 23	5,5	>99	[M] ⁺	521,2	521,2
Fmoc- Ser(O-PROXYL)-OH 25	5,4	>99	[M] ⁺	495,2	495,2
Fmoc- Tyr(O-PROXYL)-OH 26	6,3	>99	[M] ⁺	571,2	571,2

Die PROXYL funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren **23**, **25** und **26** konnten in einer hohen Reinheit mit >99 % isoliert werden und standen zur weiteren Verwendung für die SPPS zur Verfügung. Des Weiteren zeigen die Massenspektren bei allen drei Verbindungen, dass diese in der Anwendung von ESI-MS Kationradikale, $[M]^+$, bilden.²⁰⁰⁻²⁰¹

Aus den ESR-Spektren in Abbildung 5-1 geht hervor, dass alle drei Verbindung aktiv sind. Dies entspricht den Erwartungen der erfolgreichen Herstellung Radikal-funktionalisierter Fmoc-Aminosäuren. Es ist zu beachten, dass sie diesen Charakter zeigen, obwohl sie in der Entschützungsreaktion stark aziden Bedingungen ausgesetzt wurden (siehe Abbildung 5-1).

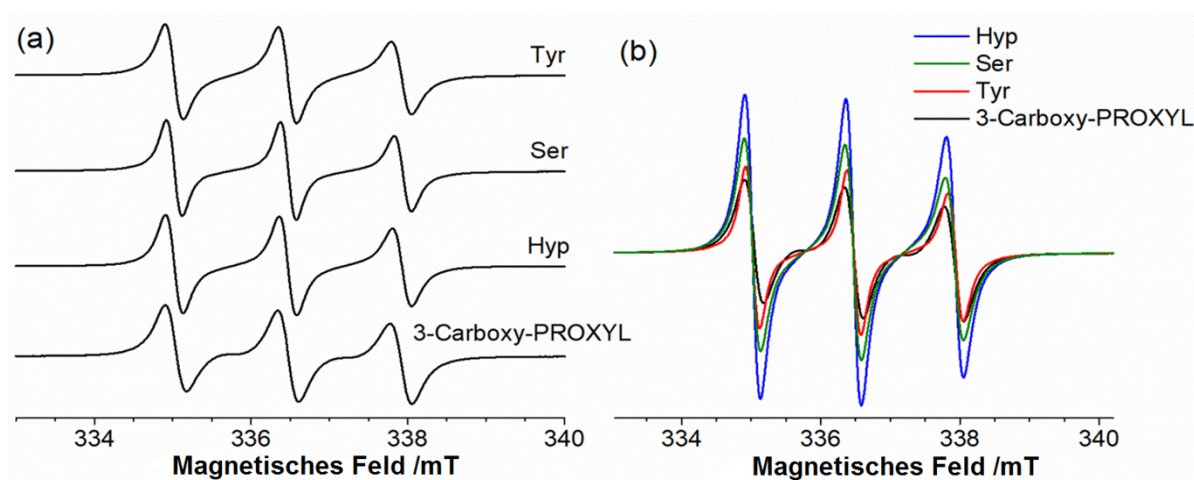
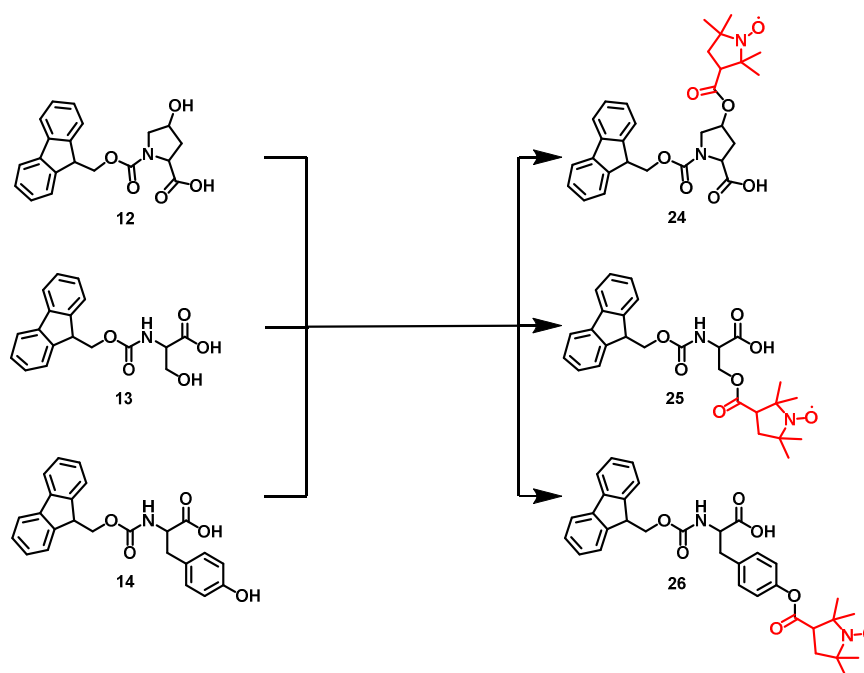


Abbildung 5-1: ESR-Spektren der finalen PROXYL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren Hyp **23**, Ser **25**, Tyr **26** und PROXYL bei 298 K. (a) Darstellung aller Spektren mit Normierung auf ihre maximale Intensität. (b) Darstellung der Spektren mit ihrer originalen Intensität ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in TCE (Tetrachlorethan) betrug.

Hiermit zeigen die PROXYL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren ihre potentielle Anwendbarkeit in den SPPS-Protokollen. Diese verwenden im letzten Reaktionsschritt ähnliche Bedingungen, um Peptide von der Festphase zu lösen und die Schutzgruppen der einzelnen Aminosäurebausteine zu entfernen.

5.1.4. Zusammenfassung und Ausblick zu PROXYL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren

In diesem Abschnitt wurde eine neue Synthesestrategie aufbauend auf der Literatur¹⁹⁷ vorgestellt. Diese wurde in der vorliegenden Arbeit optimiert und die Ergebnisse von BRODRICHT *et al.*²⁰² publiziert. Die Fmoc-Aminosäuren Hydroxyprolin (Hyp), Serin (Ser) und Tyrosin (Tyr) wurden in drei Reaktionsschritten erfolgreich mit PROXYL an ihrer Hydroxyl-Seitenkette Radikal-markiert (siehe Schema 5-7).

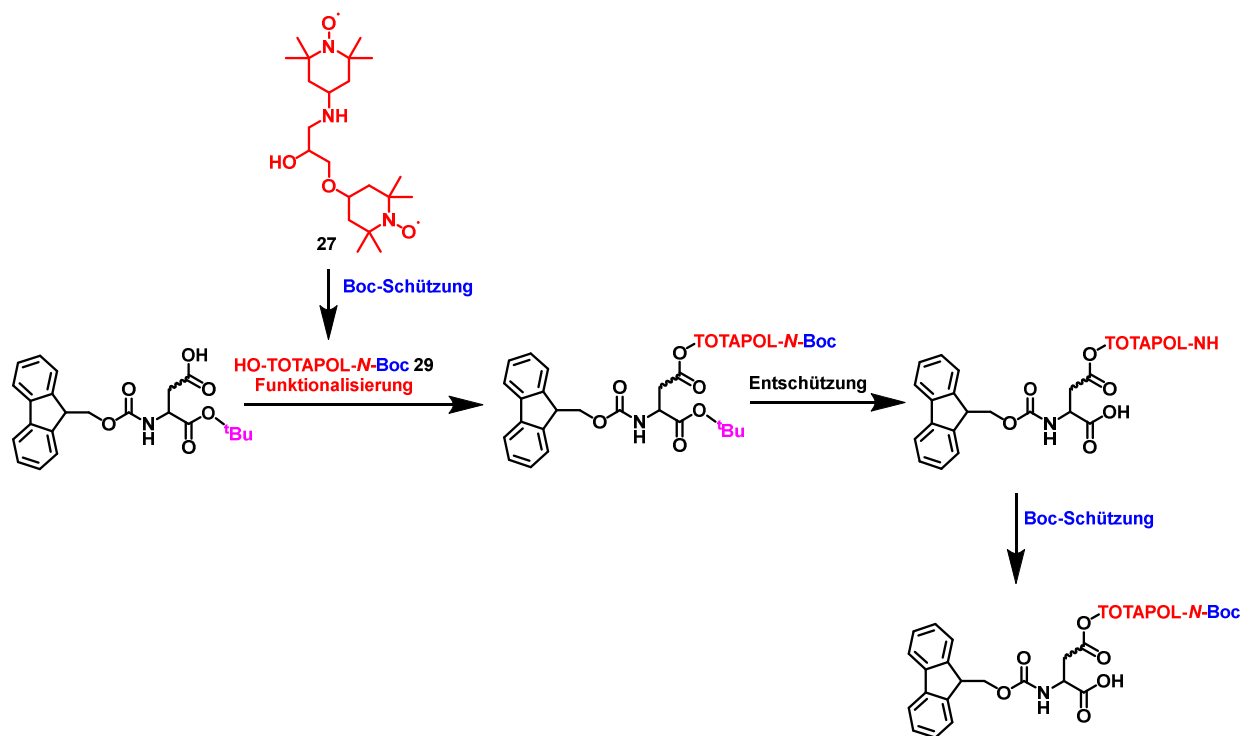


Schema 5-7: Darstellung der Edukte und Produkte der Radikal-Markierung. Die Fmoc-Aminosäuren Hydroxyprolin **12**, Serin **13** und Tyrosin **14** werden zu den PROXYL funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren **23**, **25** und **26** umgesetzt.

Die synthetisierten Bausteine zeigten die Aktivität der Nitroxylspezies in ESR-Messungen. Die fertigen Bausteine waren N-terminal durch eine Fmoc-Schutzgruppe geschützt und C-terminal für Kopplungsreaktionen zugänglich. Der vorgestellte Ansatz ermöglicht die Synthese von Seitenketten-Radikal-markierten Aminosäuren, die selbst unter den in der SPPS auftretenden sehr sauren Bedingungen radikalische Aktivität und chemische Stabilität zeigen. Dies ermöglicht die Verwendung dieser Bausteine in der Festphasen-Peptidsynthese, um biologische Moleküle spezifisch mit einer Radikal-Markierung zu versehen oder um in Zukunft Peptid-basierende Radikale für DNP-NMR-Anwendungen zu erzeugen. Schließlich ist diese universelle Radikal-Markierungsstrategie für eine Vielzahl von Aminosäuren verfügbar, die eine Hydroxylgruppe an ihrer Seitenkette aufweisen.

5.2. TOTAPOL-funktionalisierte Fmoc-Aminosäuren

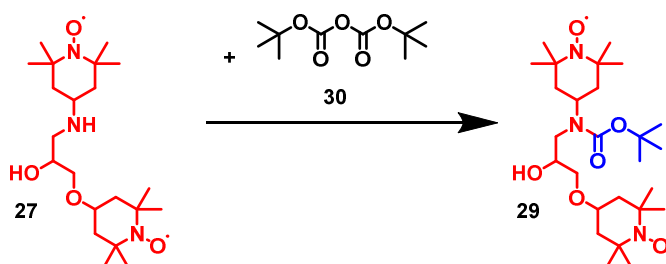
TOTAPOL **27** (1-[(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxidopiperidin-4-yl)amino]-3-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxopiperidin-1-ium-4-yl)oxypropan-2-ol) ist ein Biradikalmolekül, das in der DNP-NMR als Polarisationsmittel verwendet wird. Die Synthesestrategie einer TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure orientiert sich an der vorangegangenen PROXYL-Funktionalisierung (siehe Kapitel 5.1), wobei der erste Schritt entfällt. Durch eine C-terminal geschützte Fmoc-Aminosäure ist es möglich eine selektive TOTAPOL-Funktionalisierung an der freien Seitenkette mittels Boc **28** (2-methyl-2-propanyl)carbonat) geschütztem TOTAPOL **29** zu erreichen. Abschließend soll die *tert*-Butyl-Gruppe entfernt und das Produkt mittels präparativer HPLC aufgereinigt werden, um das reine Produkt für SPPS-Anwendungen zu erhalten.



Schema 5-8: Allgemeine Darstellung der Synthese einer TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure. Dargestellt sind die Reaktionsschritte der Boc-Schätzung von TOTAPOL **27**, die Funktionalisierung der Seitenkette mit HO-TOTAPOL-N-Boc **29** und die C-terminale Entschätzung mit anschließender erneuter Boc-Schätzung.

5.2.1. Boc-Schätzung von TOTAPOL

HO-TOTAPOL-NH **27** wurde analog zur Literatur²⁰³ mit Boc geschützt, um eine anschließende selektive Funktionalisierung ohne Konkurrenzreaktionen der sekundären Amingruppe zu erreichen. Dabei wurde die sekundäre Amingruppe von **27** mittels Boc-Anhydrid **30** (Bis(2-methyl-2-propanyl)dicarbonat) geschützt um HO-TOTAPOL-N-Boc **29** zu erhalten (siehe Schema 5-9).



Schema 5-9: Darstellung der Boc-Schätzung des sekundären Amins von TOTAPOL **27**.

Die Amin-Schätzung konnte erfolgreich mit Boc-Anhydrid **30** realisiert werden. Das geschützte TOTAPOL **29** wurde mittels HPLC und MS charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.10) und die detektierten Retentionszeiten und MS-Daten in Tabelle 5-4 aufgelistet.

Tabelle 5-4: Retentionszeiten mit prozentualem Anteil und MS-Daten des Boc-funktionalisierten TOTAPOL **29**.

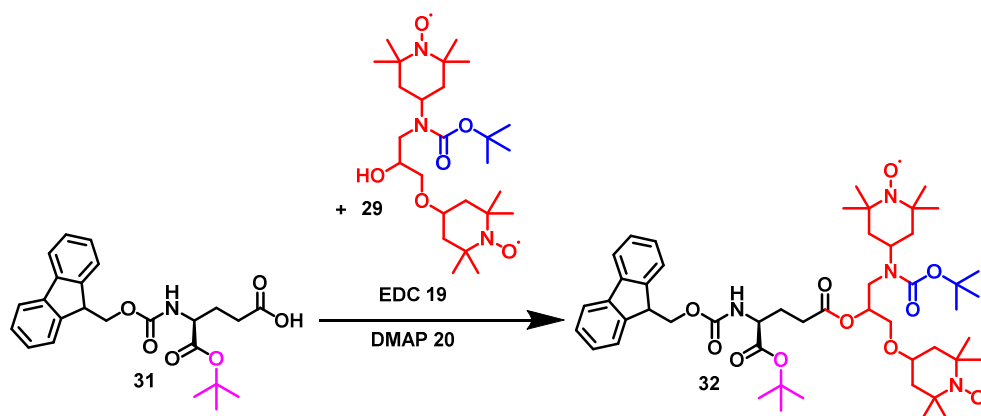
Produkt	t _R	Anteil	Ionisierung	Masse	Masse
	[min]	[%]		(beobachtet)	(berechnet)
				[m/z]	[m/z]
29	4,7	>99	[M] ⁺	499,4	499,4

29 konnte ohne weitere Aufreinigung für die Funktionalisierungsreaktion verwendet werden.

5.2.2. Herstellung und Charakterisierung einer TOTAPOL-funktionalisierten und C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure

Die TOTAPOL-Funktionalisierung der Seitenkette einer C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure soll nach IKEDA *et al.*¹⁹⁸ mittels **29** über eine Veresterung durch EDC **19** und DMAP **20** erreicht werden.

Die Reaktion wurde auf die C-terminale geschützte Fmoc-Aminosäure Fmoc-NH-L-Glu(OH)-O^tBu **31** angewendet (siehe Schema 5-10).



Schema 5-10: TOTAPOL-Funktionalisierung der Carboxy-Seitenkette der C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure **31** durch **29** mittels EDC **19** und DMAP **20**.

Die C-terminal geschützte Fmoc-Aminosäure **31** konnte erfolgreich mit HO-TOTAPOL-N-Boc **29** funktionalisiert werden. Das hergestellte Produkt **32** wurde mittels HPLC und MS charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.11) und die Retentionszeiten und MS-Daten in Tabelle 5-5 aufgelistet.

Tabelle 5-5: Retentionszeiten mit prozentualem Anteil und MS-Daten der TOTAPOL-funktionalisierten C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure **32**.

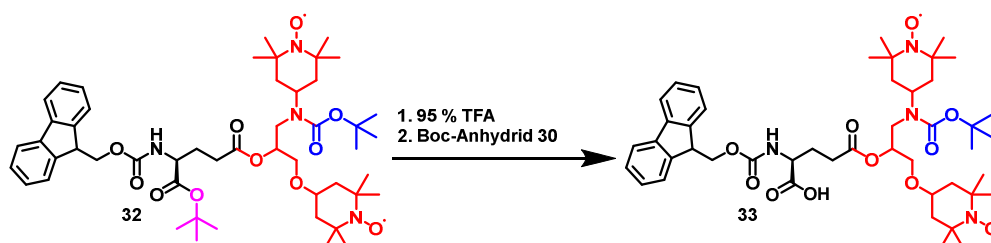
Produkt	t _R	Anteil	Ionisierung	Masse	Masse
	[min]	[%]		(beobachtet)	(berechnet)
				[m/z]	[m/z]
32	6,1	34,0	[M] ⁺	906,5	906,5

Das Produkt **32** konnte erfolgreich synthetisiert werden und wurde ohne weitere Aufreinigung für den Entschützungsprozess verwendet.

5.2.3. Herstellung und Charakterisierung einer TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure

Um die TOTAPOL funktionalisierte Fmoc-Aminosäure als SPPS-Bausteine zu erhalten, soll die temporäre C-terminale Schützung durch die *tert*-Butyl-Gruppen nach KOIVISTO *et al.* ¹⁹⁹ mittels 95%iger Trifluoressigsäure entfernt werden. Dabei wird erwartungsgemäß die Boc-Schutzgruppe ebenfalls entfernt, wodurch eine Wiederholung der Boc-Schützung notwendig wird.

Die Reaktionen wurden auf die C-terminal geschützte und TOTAPOL (N-terminal geschützte) funktionalisierte Fmoc-Aminosäure **32** angewendet (siehe Schema 5-11).



Schema 5-11: Entschützung des C-Terminus der TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure **32**.

Die TOTAPOL funktionalisierte Fmoc-Aminosäure **33** wurde mittels HPLC und MS charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.13) und die Retentionszeiten und MS-Daten in Tabelle 5-6 aufgelistet.

Tabelle 5-6: Retentionszeiten, Reinheiten und MS-Daten der TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure **33**.

Produkt	t _R	Anteil	Ionisierung	Masse	Masse
	[min]	[%]		(beobachtet)	(berechnet)
				[m/z]	[m/z]
33	7,2	>90	[M+2H] ⁺	852,5	852,5

Die BiRadikal-funktionalisierte Fmoc-Aminosäure **33** konnte mit einer Reinheit von >90 % isoliert werden. Das aufgenommene ESR-Spektrum für **33** ist in Abbildung 5-2 mit der Referenzsubstanz TOTAPOL dargestellt. DNP-Experimente konnten aufgrund des Ausfalls des Messgerätes noch nicht durchgeführt werden, sind jedoch in Planung.

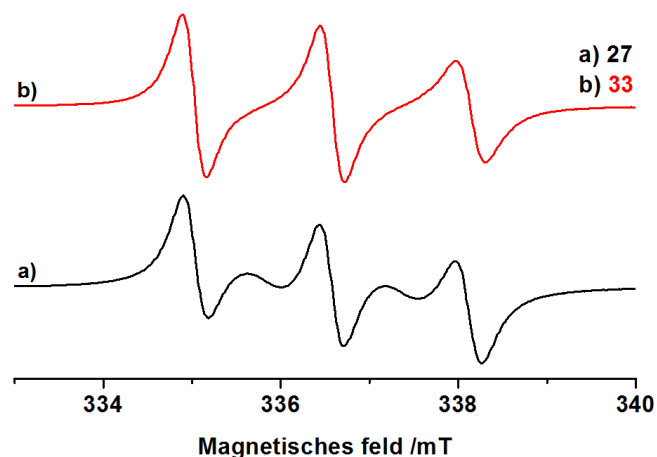
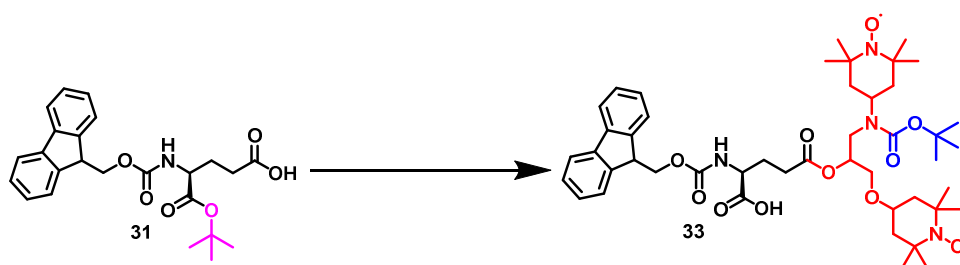


Abbildung 5-2: ESR-Spektren von a) TOTAPOL **27** (schwarz) und b) TOTAPOL funktionalisiertes Fmoc-Glu-OH **33**. Spektren wurden auf die maximale Intensität normalisiert. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch. Die Proben wurden in einer Konzentration von 15 mM in DMSO bei 293 K gemessen.

5.2.4. Zusammenfassung und Ausblick der TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure

Die Fmoc-Aminosäure Glutaminsäure (Glu) **31** wurde in drei Reaktionsschritten mit Boc-geschütztem TOTAPOL **29** an dessen Carboxy-Seitenkette Biradikal-markiert (siehe Schema 5-12).

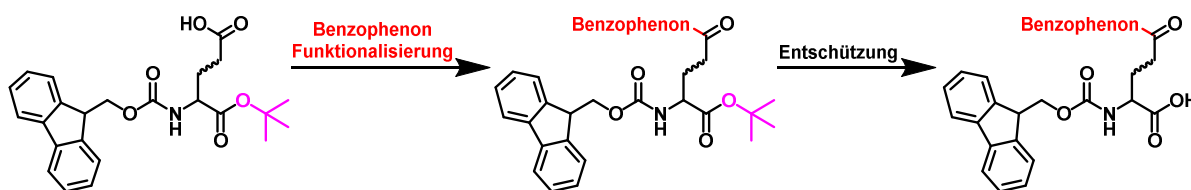


Schema 5-12: Darstellung des Edukts und Produkts der TOTAPOL-Funktionalisierung der C-terminal geschützten Fmoc-Glutaminsäure **31**, um die TOTAPOL-funktionalisierte und Boc-geschützte Fmoc-Glutaminsäure **33** zu erhalten.

Der synthetisierte Baustein zeigte die Aktivität der Nitroxylspezies in ESR-Messungen. Der fertige Baustein war N-terminal durch eine Fmoc-Schutzgruppe geschützt und C-terminal für Kopplungsreaktionen zugänglich. Der vorgestellte Ansatz ermöglicht die Synthese von Seitenketten-Biradikal-markierten Aminosäuren, die selbst unter den in SPPS auftretenden, sehr sauren Bedingungen radikalische Aktivität und chemische Stabilität zeigen. Dies ermöglicht die potentielle Verwendung dieser Bausteine in der Festphasen-Peptidsynthese, um biologische Moleküle spezifisch mit einer Biradikal-Markierung für DNP-NMR-Anwendungen zu erzeugen.

5.3. Benzophenon-funktionalisierte Fmoc-Aminosäuren

Die Synthesestrategie von Benzophenon funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren orientiert sich an der vorangegangenen TOTAPOL Funktionalisierung (siehe Kapitel 5.2). Durch eine C-terminal geschützte Fmoc-Aminosäure ist es möglich eine selektive Benzophenon Funktionalisierung an der freien Seitenkette zu erreichen. Abschließend wird die *tert*-Butyl-Gruppe entfernt und das Produkt mittels Säulenchromatographie aufgereinigt, um ein möglichst reines Produkt für SPPS-Anwendungen zu erhalten (siehe Schema 5-13).

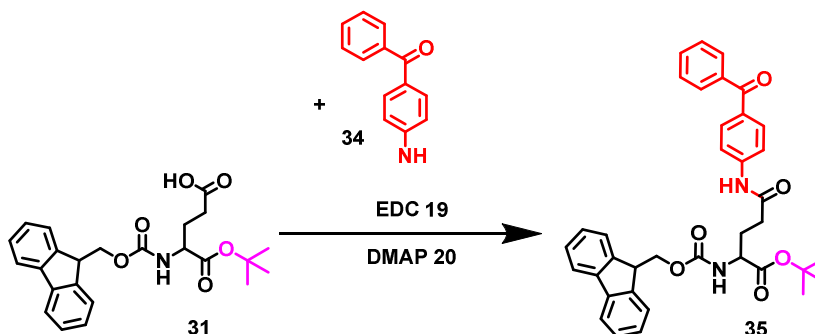


Schema 5-13: Allgemeine Darstellung der Synthese einer Benzophenon funktionalisierten Fmoc-Aminosäure. Dargestellt sind die Reaktionsschritte der Funktionalisierung der Seitenkette mit Benzophenon und die C-terminale Entschützung.

5.3.1. Herstellung und Charakterisierung einer Benzophenon-funktionalisierten C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure

Benzophenon wird in der CIDNP-NMR als Farbstoffmolekül zur Bildung des Biradikalpaares verwendet. Die Benzophenon Funktionalisierung der Seitenketten der C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure soll nach IKEDA *et al.*¹⁹⁸ mittels 3-Amino-Benzophenon **34** über eine Amidbindung mittels EDC **19** und DMAP **20** erreicht werden.

Die Reaktion wurde auf die C-terminal geschützte Fmoc-Aminosäure Fmoc-NH-L-Glu(OH)-O^tBu **31** angewendet (siehe Schema 5-14).



Schema 5-14: Darstellung der Benzophenon-Funktionalisierung der Carboxy-Seitenkette der C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure **31** mit 3-Amino-Benzophenon **34** mittels EDC **19** und DMAP **20**.

Die C-terminal geschützte Fmoc-Aminosäure **31** konnte erfolgreich mit 3-Amino-Benzophenon **34** funktionalisiert werden. Das hergestellte Produkt **35** wurde mittels HPLC und MS charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.14) und die Retentionszeiten und MS-Daten in Tabelle 5-7 aufgelistet.

Tabelle 5-7: Retentionszeiten mit prozentualen Anteil und MS-Daten der Benzophenon-funktionalisierten C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure **35**.

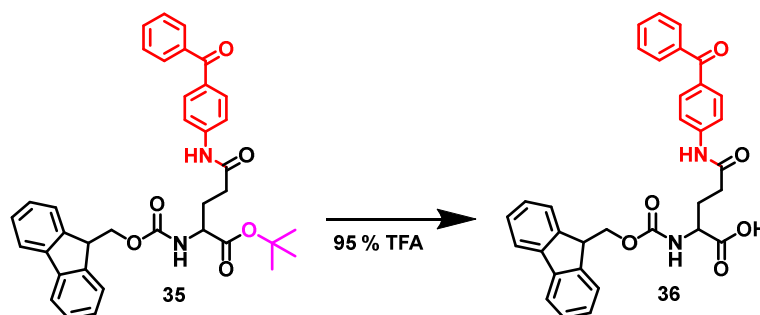
Produkt	t _R [min]	Anteil [%]	Ionisierung	Masse (beobachtet) [m/z]	Masse (berechnet) [m/z]
35	7,4	60,9	[M+H] ⁺	605,3	605,3

Das Produkt **35** konnte erfolgreich synthetisiert werden und konnte ohne weitere Aufreinigung für die Entschützungsreaktion verwendet werden.

5.3.2. Herstellung und Charakterisierung einer Benzophenon-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure

Um die Benzophenon funktionalisierte Fmoc-Aminosäure als SPPS-Baustein zu erhalten, soll die temporäre C-terminale Schützung durch die tert-Butyl-Gruppen nach KOIVISTO *et al.*¹⁹⁹ mittels 95%iger Trifluoressigsäure entfernt werden.

Die Reaktion wurde auf die C-terminal geschützte und Benzophenon funktionalisierte Fmoc-Aminosäure **35** angewendet (siehe Schema 5-15).



Schema 5-15: Entschützung des C-Terminus der Benzophenon funktionalisierten Fmoc-Aminosäure **35** zum markierten Produkt **36**.

Die Benzophenon funktionalisierte Fmoc-Aminosäure **36** wurde mittels HPLC, MS, ¹H-NMR und ¹³C-NMR charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.15) und die Retentionszeiten und MS-Daten in Tabelle 5-8 aufgelistet.

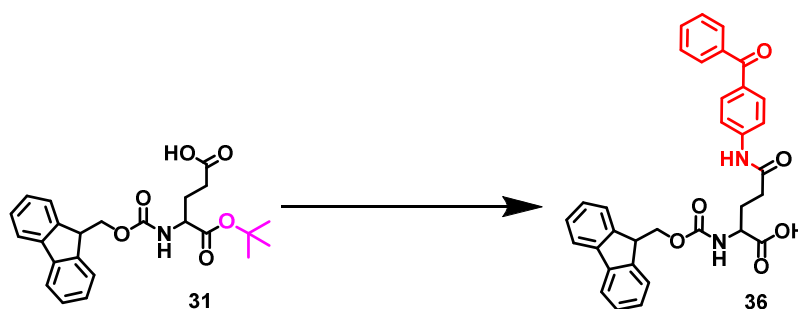
Tabelle 5-8: Retentionszeiten, Reinheiten und MS-Daten der Benzophenon funktionalisierten Fmoc-Aminosäure **36**.

Produkt	t _R [min]	Anteil [%]	Ionisierung	Masse (beobachtet) [m/z]	Masse (berechnet) [m/z]
36	5,5	>99	[M+H] ⁺	549,2	549,2

Die Benzophenon funktionalisierte Fmoc-Aminosäure **36** konnte in einer hohen Reinheit mit >99 % isoliert werden und stand zur weiteren Verwendung für die SPPS zur Verfügung.

5.3.3. Zusammenfassung und Ausblick zu Benzophenon-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren

Die C-terminal geschützte Fmoc-Aminosäure Glutaminsäure (Glu) **31** wurde in zwei Reaktionsschritten mit Benzophenon an dessen Carboxy-Seitenkette markiert (siehe Schema 5-16).



Schema 5-16: Darstellung der Benzophenon-Funktionalisierung der Carboxy-Seitenkette der C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure **31** zum markierten Produkt **36**.

Der synthetisierte Baustein zeigte eine erfolgreiche Anbindung, welche durch HPLC-, ESI-MS- und NMR-Analytik nachgewiesen wurde. Der fertige Baustein war N-terminal durch eine Fmoc-Schutzgruppe geschützt und C-terminal für Kopplungsreaktionen zugänglich. Der vorgestellte Ansatz ermöglicht die Synthese von Seitenketten-Benzophenon-markierten Aminosäuren, die selbst unter den in SPPS auftretenden harten sauren Bedingungen chemische Stabilität zeigen. Dies ermöglicht die Verwendung dieser Bausteine in der Festphasen-Peptidsynthese, um biologische Moleküle spezifisch mit einer Benzophenon-Markierung für CIDNP-NMR-Anwendungen zu erzeugen.



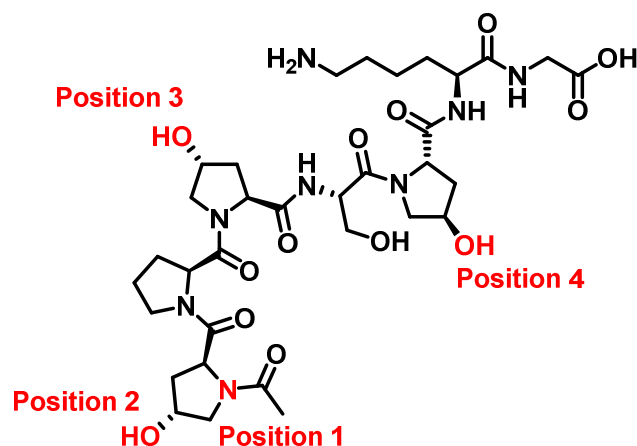
6. Funktionalisierte Peptide

Die hergestellten funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren sollen als Baustein in SPPS-Protokollen verwendet werden. Ebenfalls werden Peptide ohne Funktionalisierung hergestellt um als Referenzsubstanzen zu dienen.

6.1. PROXYL-funktionalisierte Peptide

In diesem Abschnitt werden Radikal-funktionalisierte Peptide vorgestellt, die mit der PROXYL funktionalisierten Fmoc-Aminosäure Hydroxyprolin **23** hergestellt wurden. Dabei soll der Einfluss der markierten Fmoc-Aminosäure im Vergleich zu einem Referenz-Peptid betrachtet werden und ausgehend von der ESR-Analytik die Anwendbarkeit der Peptide für DNP-Experimente geprüft und diese schließlich in einfachen DNP-Experimenten gezeigt werden. Auf Basis der aus der Literatur²⁰⁴ bekannten notwendigen Steifigkeit von Radikalen für erhöhte Signalverstärkung in DNP-Experimenten erscheinen rigide Biradikal-Systeme geeignet um hohe Signalverstärkungen in DNP-Experimenten zu erreichen. Somit sollte Hydroxyprolin ein geeignetes System für Untersuchungen sein, da durch seine zyklische Struktur die Seitenkette eine verminderte Anzahl an Freiheitsgraden aufweist.

Hierfür wurde eine nicht natürlich vorkommende Heptapeptid-Sequenz bestehend aus Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly **37** gewählt. Die drei Positionen der Hydroxproline (siehe Abbildung 6-1) stellen die möglichen Positionen der markierten Fmoc-Aminosäure **23** dar. Zusätzlich ist es noch möglich mit dem Radikal 3-Carboxy—PROXYL **8** den N-Terminus des Peptides zu markieren und somit eine vierte Stelle zu schaffen, die auch für mögliche Biradikale verwendet werden kann. Somit können vier Positionen in einer Sequenz für den Einbau einer Radikal-funktionalisierung untersucht werden und zusätzlich drei Biradikale mit unterschiedlichen Abständen der Radikalzentren hergestellt werden. So kann neben dem Einbau der Radikal-Fmoc-Aminosäure **23** die Entwicklung neuartiger Peptid-Biradikale untersucht werden.



37

Abbildung 6-1: Darstellung der gewählten Peptid-Sequenz **37** zur Untersuchung der Radikal-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure **23**. Rote Atome stellen die vier möglichen Funktionalisierungspositionen dar.

Für Untersuchungen der Effizienz in DNP-Anwendungen sind der Abstand der Radikalzentren und die Steifigkeit der Struktur von entscheidender Bedeutung, um eine möglichst hohe Signalverstärkung zu erreichen.²⁰⁴ Die verwendete Struktur wurde von Hydroxyprolin zu Prolin vereinfacht um molekulardynamische (*molecular dynamics*, MD) und Replika-Austausch molekulardynamische (*replica exchange molecular dynamics*, REMD) Simulationen mittels bekannter Daten durchführen zu können. Diese wurden von Herrn Dr. David Rosenberger am *National Laboratory* in Los Alamos durchgeführt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Hierbei ergaben die Simulationen eine hohe Steifigkeit für eine Struktur (siehe Abbildung 6-2) mit einem Abstand von Prolin-1 zu Prolin-4 mit $1,16 \pm 0,089$ nm (MD) bzw. $1,14 \pm 0,106$ nm (REMD). Im Vergleich hierzu besitzen die Radikalzentren des Biradikals TOTAPOL **19** einen Abstand von $1,25 \pm 0,35$ nm voneinander.²⁰⁵

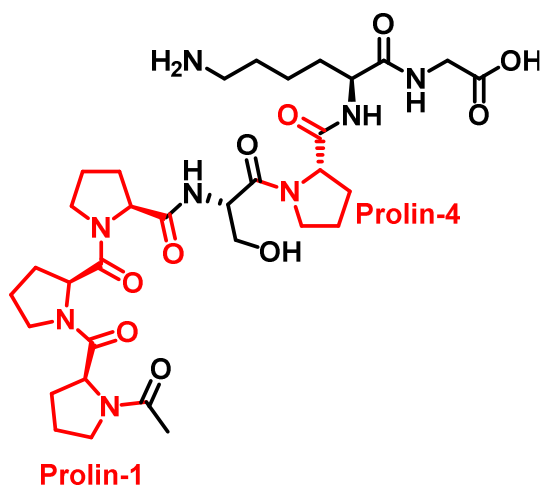


Abbildung 6-2: Modell-Peptidsequenz zur Bestimmung der Abstände zwischen Prolin-1 und Prolin-4.

Zur Analyse der Beeinflussung der Ausbeute in der Peptidsynthese durch die Verwendung des Radikal-Aminosäurebausteins wurde das Referenzpeptid **37** ohne Radikalfunktion parallel unter gleichen Reaktionsbedingungen hergestellt. Statt des Radikal-Aminosäurebausteins **23** wurde dessen Edukt Fmoc-Hydroxyprolin **12** verwendet und die Ausbeuten der einzelnen Peptide nach der Aufreinigung verglichen. So können die Einflüsse von Kopplungseffizienz und Kettenabbrüchen direkt anhand der Ausbeuten der Bausteine mit unterschiedlichen Positionen von **23** verglichen werden. Die Ausbeuten und Reinheiten der Peptide sind in Tabelle 6-1 aufgelistet.

Tabelle 6-1: Auflistung der Ausbeuten in Prozent und der Reinheiten (HPLC) der mit PROXYL funktionalisierten Radikal-Peptide.

Peptidsequenz	Ausbeute [% d. theo. Ausbeute]	Reinheit [%]
Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 37	32,4	>99
PROXYL -Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 38	23,7	98
Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 39	26,6	98
Acetyl-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 40	20,6	>99
Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 41	17,8	>99
PROXYL -Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42	6,6	93
PROXYL -Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 43	11,0	>99
PROXYL -Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44	8,4	97

Das Referenzpeptid **37** und die Mono- sowie Bi-Radikal-Peptide konnten erfolgreich in einer hohen Reinheit isoliert werden. Im Vergleich zum Referenzpeptid nehmen die absoluten Ausbeuten erwartungsgemäß bei den Mono-Radikal-Peptiden von **37** zu **41** ab. Je früher der Einbau einer Kopplungs-anspruchsvollen Fmoc-Aminosäure stattfindet, desto mehr Kettenabbrüche oder Unterbrechungen finden statt. Jedoch ist zu beobachten, dass die Ausbeuten für die drei erwähnten Peptide nur maximal um ein Drittel im Vergleich zur Referenz **37** fallen. Die Biradikal-Peptide **42**, **43** und **44** lassen keinen Trend bezüglich der Ausbeuten erkennen, da hier neben dem Radikal-Baustein **23** zusätzlich am N-Terminus 3-Carboxy-Proxyl **8** gekoppelt wurde. Hierdurch kommt ein weiterer Faktor für die Beeinflussung der Kopplungseffizienz hinzu.

Im Weiteren wurden die hergestellten Peptide mittels HPLC und ESI-MS charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.17-12.24). In Tabelle 6-2 sind die Retentionszeiten und gefundenen Molekül-Ionisierungen im Vergleich mit den berechneten Molekül-Ionisierungen dargestellt.

Tabelle 6-2: Retentionszeiten und MS-Daten der mit PROXYL funktionalisierten Radikal-Peptide.

Peptidsequenz	t _R [min]	Ionisierung	Masse (beobachtet) [m/z]	Masse (berechnet) [m/z]
37	9,0	[M+H] ⁺	769,4	769,4
38	13,7	[M+2H] ⁺	896,5	896,5
39	17,9	[M+2H] ⁺	938,5	938,5
40	15,9	[M+H] ⁺	937,5	937,5
41	12,5	[M+2H] ⁺	938,5	938,5
42	22,8	[M+3H] ⁺	1065,6	1065,6
43	21,0	[M+3H] ⁺	1065,6	1065,6
44	19,8	[M+H] ⁺	1063,6	1063,6

Aus den ESI-MS-Daten ist zu erkennen, dass fast alle hergestellten Radikal-Peptide entgegen der Erwartung neben dem ionisierenden Proton entweder eine Proton-Masse mehr für Monoradikale (**38**, **39** und **41**) oder zwei Proton-Massen mehr für Biradikale (**42** und **43**) aufweisen. Zusätzlich dazu ist für fast alle Radikal-Peptide, außer für **40** und **44**, der dominierende Ionenpeak der Isotopen-Verteilung die vollständig protonierte Spezies (siehe Anhang, Kapitel 12.17-12.24). So ist zu vermuten, dass in allen Verbindungen, außer **40** und **44**, die Radikale deaktiviert bzw. protoniert vorliegen.

Die folgenden ESR-Messungen (siehe Abbildung 6-3) sollen zeigen, ob diese Vermutungen aus den Beobachtungen der ESI-MS bestätigt werden können und die Peptidradikale **40** und **44** die einzigen aktiven Radikale sind.

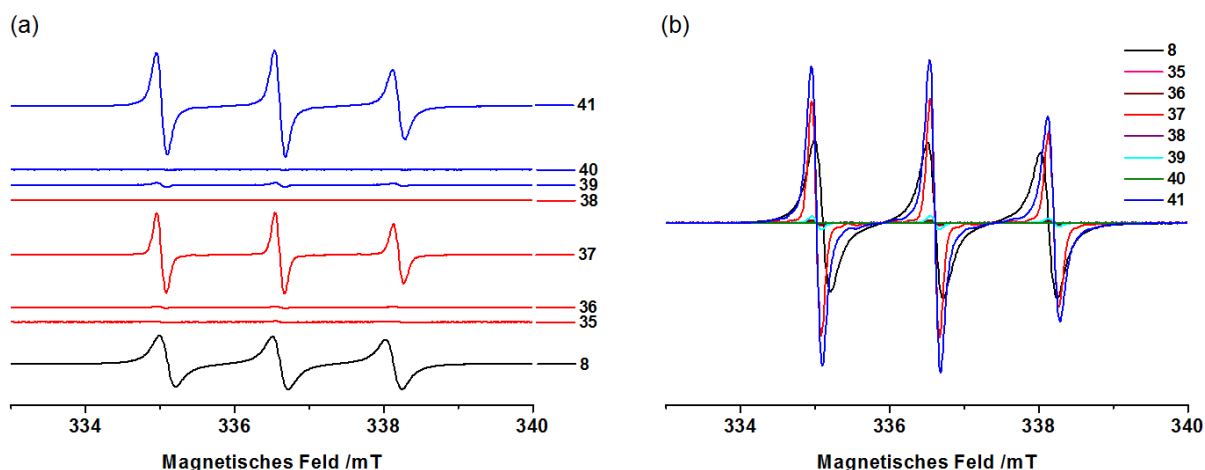


Abbildung 6-3: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und der Radikal-funktionalisierten Radikalpeptide **38-44** bei 298 K. (a) Darstellung aller Spektren ohne Normierung der Monoradikalpeptide **35-38** (rot) und Biradikalpeptide **38-44** (blau). (b) Darstellung der Spektren mit ihrer Intensität im direkten Vergleich. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration der Peptid-Radikallösungen jeweils 5 mM in H₂O betrug und bei 3-Carboxy-PROXYL **8** ebenfalls 5 mM jedoch in H₂O/MeCN 1/1 (v/v).

Die ESR-Spektren der Radikalpeptide **38-44** zeigen im Vergleich zu 3-Carboxy-PROXYL **8** (Referenz-Radikal), dass nur **40** und **44** ähnlich aktiv sind wie das Monoradikal **6**. Hierbei sollten Monoradikal-Peptide die gleiche Fläche der Signale wie die Referenz besitzen, wenn alle Radikale aktiv vorliegen. Dementsprechend wird erwartet, dass Biradikale die doppelte Fläche aufweisen sollten. Die semiquantitative Betrachtung der Integrale ergab, dass tendenziell dies einzig für **40** (Monoradikal-Peptid) und **44** (Biradikal-Peptid) beobachtet werden konnte (siehe Tabelle 6-3).

Tabelle 6-3: Auflistung der absoluten Integrale (333 bis 340 mT) der ESR-Spektren der Radikalpeptide **38-44** und des Referenz-Monoradikals **8** mit prozentualem Anteil an aktiven Radikalen im Vergleich zum Referenz-Monoradikal **8**.

Verbindung Integral Aktive Radikale im Vergleich zum
Referenz-Monoradikal
[%]

8	14514	100
38	274	1,9
39	261	1,8
40	9687	66,7
41	90	0,6
42	570	3,9
43	108	0,7
44	16722	115,2

Somit können die Ergebnisse der ESI-MS-Messungen untermauert werden und ausschließlich **40** und **44** als aktive Radikalpeptide bestätigt werden.

40 und **44** wurden anschließend für DNP-Untersuchungen verwendet (siehe Abbildung 6-4 und Abbildung 6-5), um ihren Einsatz als Polarisationsagenzien zu untersuchen.

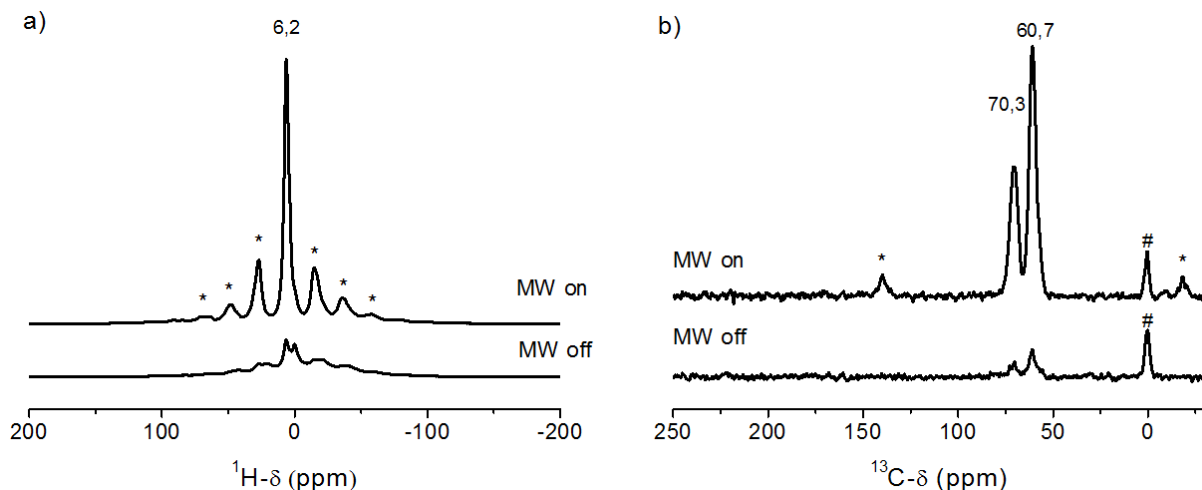


Abbildung 6-4: ^1H - (a) und $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR-Spektren (b) von 15 mM des Peptidradikals **40** in einer Glycerin- $\text{d}_8/\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ -Matrix mit (MW on) und ohne (MW off) Mikrowellenbestrahlung, gemessen bei 9,4 Tesla mit 8 kHz Spinnrate. In den ^{13}C -Spektren beziehen sich die beiden Signale bei 60,7 ppm und 70,5 ppm auf das Glycerin, wobei das mit # bezeichnete Signal bei 0 ppm dem Siliziumstopfen zuzuordnen ist, der zum Einschluss der Flüssigkeit im NMR-Rotor verwendet wird. Die Sternchen markieren die Rotationsseitenbanden des Glycerins in den ^{13}C -Spektren und die Rotationsseitenbanden des Wassers in den ^1H -Spektren.

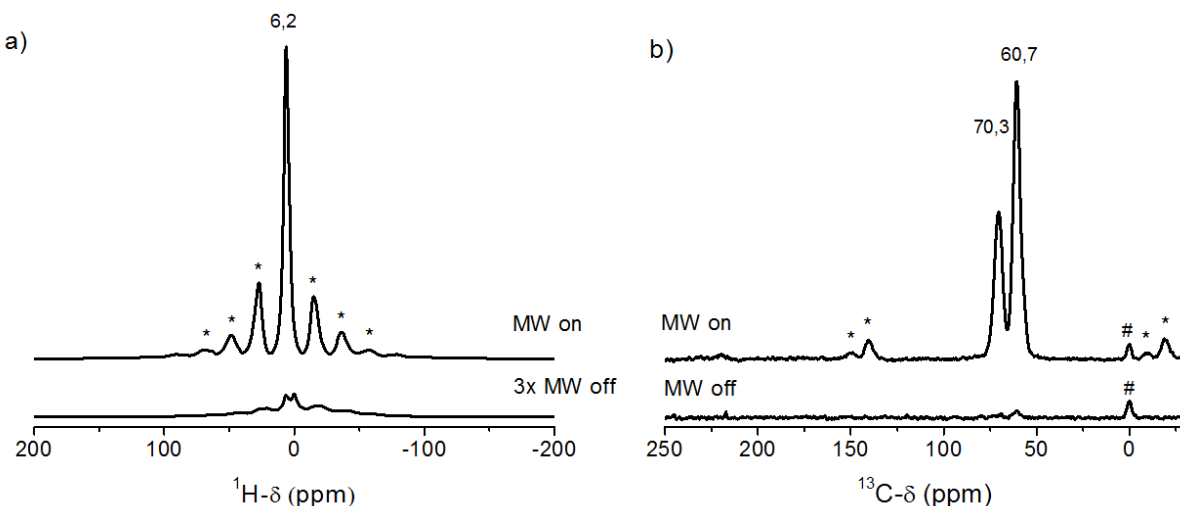


Abbildung 6-5: ^1H - (a) und $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR-Spektren (b) von 15 mM des Peptidradikals **44** in einer Glycerin- $\text{d}_8/\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ -Matrix mit (MW on) und ohne (MW off) Mikrowellenbestrahlung, gemessen bei 9,4 Tesla mit 8 kHz Spinnrate. Hierbei wurde das ^1H -Spektrum ohne Mikrowellenbestrahlung in (a) mit dreifacher Vergrößerung dargestellt. In den ^{13}C -Spektren beziehen sich die beiden Signale bei 60,7 ppm und 70,5 ppm auf das Glycerin, wobei das mit # bezeichnete Signal bei 0 ppm dem Siliziumstopfen zuzuordnen ist, der zum Einschluss der Flüssigkeit im NMR-Rotor verwendet wird. Die Sternchen markieren die Rotationsseitenbanden des Glycerins in den ^{13}C -Spektren und die Rotationsseitenbanden des Wassers in den ^1H -Spektren.

Es konnten ^1H -MAS-NMR- (Abbildung 6-4a und Abbildung 6-5a) und $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR-Spektren (Abbildung 6-4b und Abbildung 6-5b) aufgenommen werden, um die Effizienz des Polarisationstransfers für DNP-Anwendungen zu untersuchen. Die Proben wurden als 15 mM-Lösung in Glycerin- $\text{d}_8/\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O} = 60/30/10\%$ (v/v/v) hergestellt, die bei 100 K eine glasartige Matrix bildet. Vergleicht man die ^1H -MAS-Spektren (Abbildung 6-4a und Abbildung 6-5a) mit Mikrowellenbestrahlung (*MW On*) und ohne Mikrowellenbestrahlung (*MW Off*), so ist zu beobachten, dass die Signalintensität unter MW-Bestrahlung im Vergleich zum *MW Off*-Spektrum um den Faktor 7 für **40** bzw. 41 für **44** verstärkt sind.

Ähnliche Signalverstärkungen werden in den $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CP MAS NMR-Spektren dieser Proben für die Signale der Kohlenstoffe des Glycerins bei 60,7 und 70,5 ppm beobachtet. Beide Signale sind um den Faktor 10 für **40** bzw. 40 für **44** verstärkt (Abbildung 6-4b und Abbildung 6-5b), was einer Messzeitreduzierung um den Faktor 100 für **40** bzw. 1600 für **44** entspricht. Das bedeutet, dass die Verwendung dieser Radikal-Markierung in der Festkörper-DNP-Analytik die Messzeit im Vergleich zur Standard-Festkörper-NMR von 100 Tagen für **40** und von über 4 Jahren für **44** auf einen Tag reduziert. Aufgrund der relativ geringen Größe der Radikalpeptide sind durch Signalauslöschungen nur die ^{13}C -Kerne der Matrix im Spektrum sichtbar. Dieses Phänomen wurde für andere Nitroxidradikal-Systeme, die in DNP-NMR-Experimenten²⁰⁶⁻²⁰⁷ verwendet wurden, sowie für Radikal-Markierungen in Proteinsystemen²⁰⁸ ausführlich beschrieben.

6.1.1. Reaktivierungsstudien der Radikale der funktionalisierten Peptide

Die nicht aktiven Peptidradikale wurden mit unterschiedlichen pH-Studien untersucht, um ihren Radikalcharakter zu regenerieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass dies für vergleichbare Radikalbausteine prinzipiell möglich ist.³⁴

Beispielhaft wurde **43** für die Reaktivierungsstudien verwendet. Hierfür wurde zunächst die aus der Literatur bekannte Methode verwendet und das Radikalpeptid in wässriger Ammoniak-Lösung auf den pH-Wert = 9,4 eingestellt und anschließend mittels ESR analysiert (siehe Abbildung 6-6).

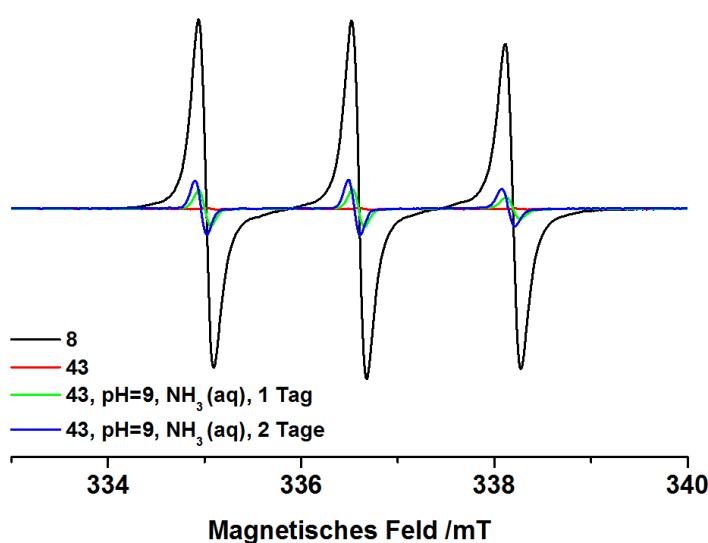


Abbildung 6-6: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und dem Biradikalpeptid **43** bei 298 K. Darstellung aller Spektren ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in H₂O betrug und der pH-Wert auf 9 mittels Ammoniaklösung (NH₃(aq)) eingestellt wurde.

Es ist zu beobachten, dass die Radikal-Aktivität des Biradikals **43** im Zuge des Reaktivierungsversuches mittels wässriger Ammoniaklösung ansteigt, jedoch auch nach längerem Inkubieren nicht signifikant weiter steigt und weitaus niedriger ist als für das Referenz-Monoradikal **8**. Somit erscheint die in der Literatur beschriebene Technik für die Reaktivierung ungeeignet zu sein. In einem weiteren Schritt wurde Natriumhydroxid (siehe Abbildung 6-7) auf seine Eignung zur Reaktivierung der Radikale untersucht.

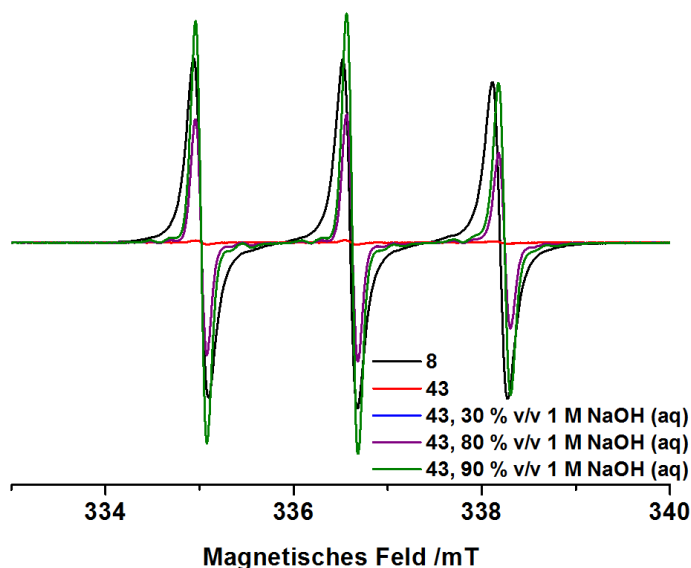


Abbildung 6-7: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und dem Biradikalpeptid **43** bei 298 K. Darstellung aller Spektren ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in H₂O betrug und **43** mit unterschiedlichen Volumina an 1 M Natriumhydroxid (NaOH) versetzt wurde.

Es ist zu beobachten, dass mit steigender NaOH-Konzentration die Radikalaktivität von **43** weitestgehend wiederhergestellt werden kann. Während im Bereich von 30 % v/v zu 80 % v/v keine Steigerung der Intensität zu beobachten ist, steigt diese bei 90 % v/v 1 M NaOH stark an. Da Natriumhydroxid als anorganische, nukleophile Base zur Zersetzung von Biomolekülen führen kann, wurde eine HPLC-Analytik durchgeführt (siehe Abbildung 6-8).

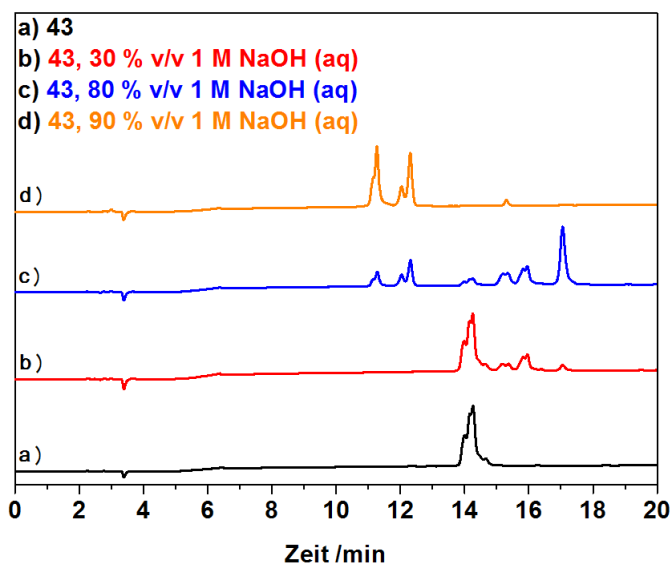


Abbildung 6-8: HPLC-Chromatogramm von **43** in unterschiedlichen Volumenprozent an 1M Natriumhydroxid (NaOH).

Es ist zu beobachten, dass sich bereits bei 30 % v/v 1 M NaOH das Peptid **43** zu zersetzen beginnt und bei 90 % v/v kein Peptid **43** mehr vorhanden ist. Schlussfolgernd ist NaOH ungeeignet, um eine Reaktivierung der Radikale zu erreichen.

Um die Radikalaktivität auf ihre pH-Abhängigkeit zu überprüfen wurde **43** zusätzlich in verschiedenen wässrigen Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten gelöst und mittels ESR untersucht.

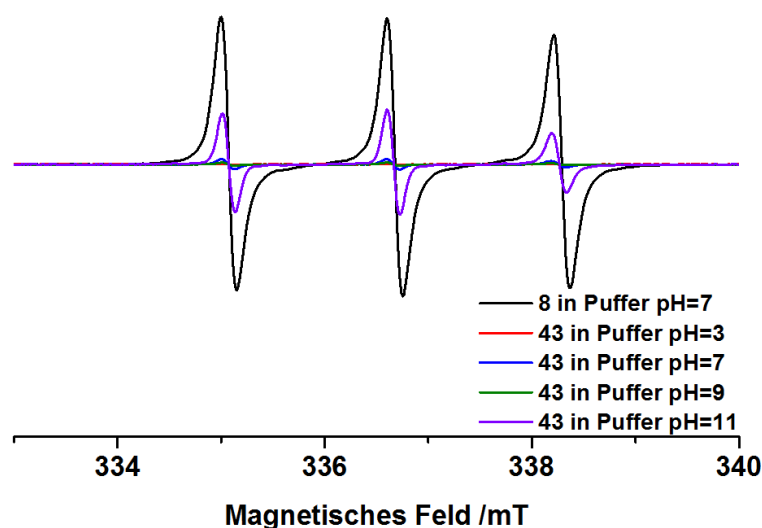


Abbildung 6-9: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und dem Biradikalpeptid **43** bei 298 K. Darstellung aller Spektren ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in verschiedenen wässrigen pH-Puffern betrug.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-9 dargestellt. **43** zeigt erst bei einem pH-Wert von 11 eine signifikante Steigerung der Aktivität im ESR-Spektrum, wobei auch bei diesem pH-Wert nicht annähernd die Aktivität des Monoradikals **8** erreicht werden kann. Um eine mögliche Zersetzung zu untersuchen, wurden HPLC-Analysen durchgeführt deren Ergebnisse in Abbildung 6-10 dargestellt werden.

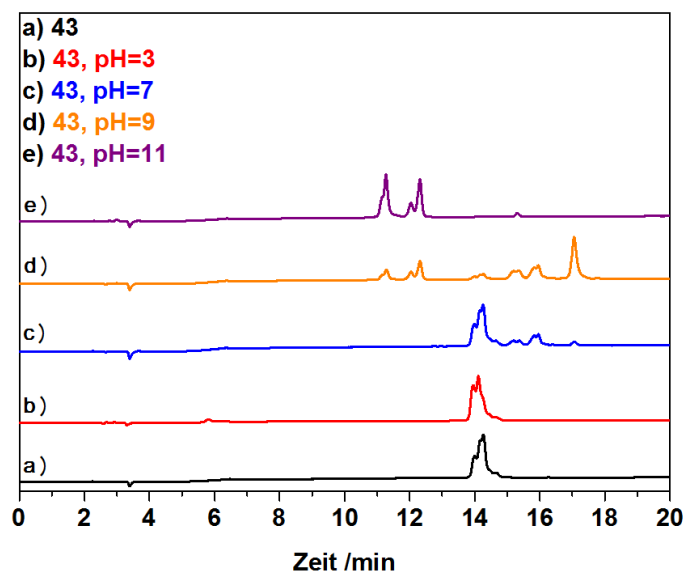


Abbildung 6-10: HPLC-Chromatogramme des Biradikalpeptid **43** in unterschiedlichen pH-Puffern gelöst.

Es ist zu beobachten, dass bei $\text{pH} = 9$ die Zersetzung bereits weit fortgeschritten ist und bei $\text{pH} = 11$ das Peptid **43** praktisch vollständig zersetzt ist.

Um den Zersetzungscharakter zu eliminieren, wurden anschließend nicht nukleophile Basen wie Diisopropylethylamin **6** und Triethylamin verwendet, um den Einfluss auf die Radikalaktivität zu untersuchen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6-11 und Abbildung 6-12 dargestellt.

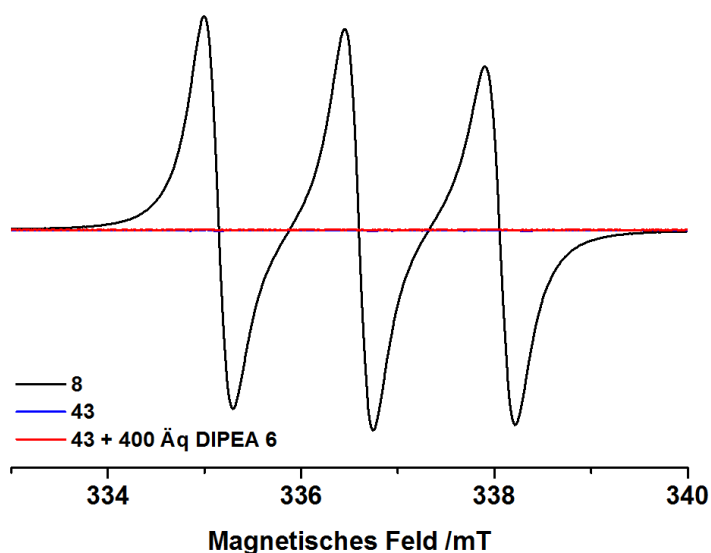


Abbildung 6-11: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und dem Biradikalpeptid **43** bei 298 K. Darstellung aller Spektren ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in TCE (Tetrachlorethan) betrug und **43** mit 400 Äquivalenten Diisopropylethylamin **6** (DIPEA) versetzt wurde.

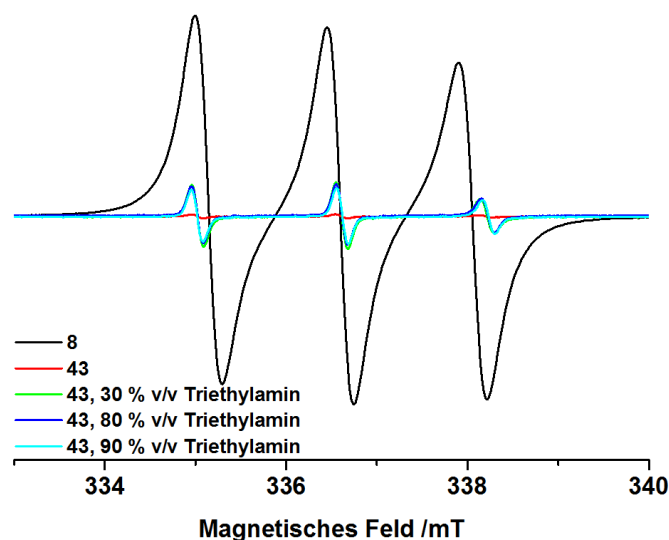


Abbildung 6-12: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und dem Biradikalpeptid **43** bei 298 K. Darstellung aller Spektren ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in TCE (Tetrachlorethan) betrug und **43** mit unterschiedlichen Volumina an Triethylamin versetzt wurde.

Es konnte bei keinen der beiden nicht nukleophilen Basen ein die Radikalaktivität des Biradikalsystems regeneriert werden oder die gleiche Aktivität der Monoradikal-Referenzsubstanz erreicht werden. Es ist ein Anstieg der Radikalaktivität zu erkennen, jedoch steigt er nicht bei Zunahme der Konzentration an nicht nukleophiler Base. Es kann somit kein signifikanter Effekt auf die Radikalaktivität des repräsentativen Biradikales **43** durch ESR festgestellt werden.

6.1.2. Reproduktion der Biradikalpeptide mit angepasster Aufreinigung

Da Nitroxyl-Radikale bei sauren Bedingungen deaktiviert vorliegen können, und somit die zuvor hergestellten Radikalpeptide (außer **40** und **44**) keine signifikante Radikalaktivität zeigten, wurde im Folgenden der Aufreinigungsschritt angepasst. Der bisherige Aufreinigungsschritt erfolgte mittels präparativer HPLC mit 0,1 %iger TFA im Laufmittel. Diese wird nun durch semipräparative Aufreinigung mittels HPLC mit reinem Wasser und Acetonitril im Laufmittel ersetzt.

Die Ausbeuten und Reinheiten der reproduzierten Peptide **42**, **43** und **44** sind in Tabelle 6-4 aufgelistet.

Tabelle 6-4: Auflistung der Ausbeuten in Prozent und der Reinheiten (HPLC) der reproduzierten mit PROXYL funktionalisierten Bi-Radikal-Peptide **42-44**.

Peptidsequenz	Ausbeute [% d. theo. Ausbeute]	Reinheit [%]
Reproduzierte 42	1,9	>99
Reproduzierte 43	5,1	>99
Reproduzierte 44	4,4	>99

Es ist zu beobachten, dass die Aufreinigung ohne TFA die Ausbeuten negativ beeinflusst und die Ausbeuten um bis zu 71 % im Vergleich zur aziden Aufarbeitung zurückgehen.

Die hergestellten Peptide wurden mittels HPLC und ESI-MS charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.25-12.27). In Tabelle 6-5 sind die Retentionszeiten und detektierten Ionenpeaks sowie die berechneten Massenpeaks aufgelistet.

Tabelle 6-5: Retentionszeiten und MS-Daten der reproduzierten, mit PROXYL funktionalisierten Bi-Radikal-Peptide 42-44.

Peptidsequenz	t_R [min]	Ionisierung	Masse (beobachtet) [m/z]	Masse (berechnet) [m/z]
Reproduzierte 42	22,3	$[M+H]^+$	1063,6	1063,6
		$[M+2H]^{2+}$	532,8	532,8
Reproduzierte 43	20,4	$[M+H]^+$	1063,6	1063,6
		$[M+2H]^{2+}$	532,8	532,8
Reproduzierte 44	20,1	$[M+H]^+$	1063,6	1063,6
		$[M+2H]^{2+}$	532,8	532,8

Anhand der ESI-MS-Daten ist zu erkennen, dass alle hergestellten Radikal-Peptide im Vergleich zu den azid aufgearbeiteten Radikal-Peptiden (Vgl. siehe Tabelle 6-2) die Ionenpeaks des einfach durch ein Proton ionisierten und zweifach mit zwei Protonen ionisierten Molekülonen zeigen. Hierbei sind dies auch die dominierenden Molekülonen (siehe Anhang, Kapitel 12.25-12.27), welche die Massen der aktiven Radikal-Spezies darstellen. Zur Validierung dieser Beobachtung wurden ESR-Spektren der reproduzierten Radikalpeptide aufgenommen (siehe Abbildung 6-13)

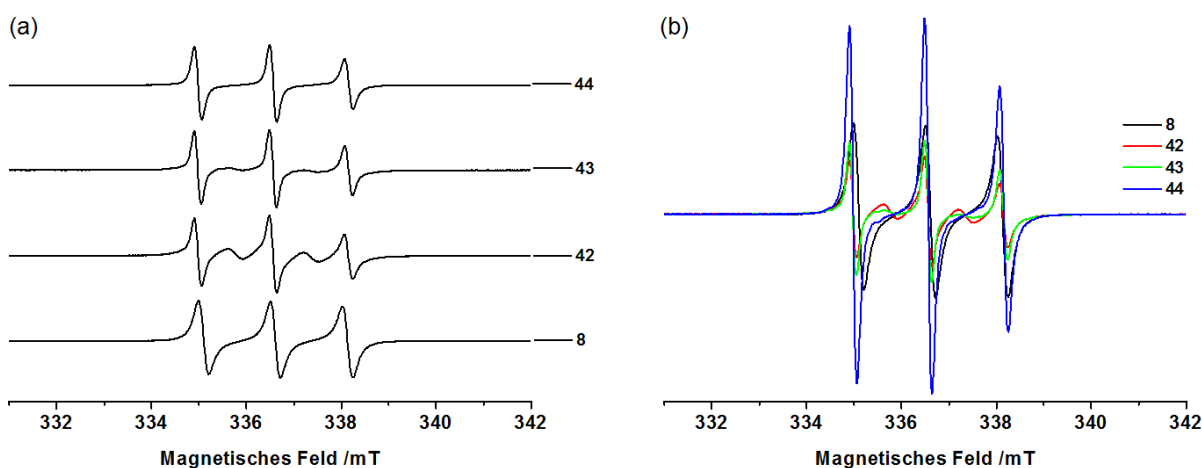


Abbildung 6-13: ESR-Spektren der reproduzierten, funktionalisierten Radikalpeptide 42, 43, 44 und 3-Carboxy-PROXYL 8 bei 298 K. (a) Darstellung aller Spektren mit Normierung auf ihre maximale Intensität. (b) Darstellung der Spektren mit ihrer ursprünglichen Intensität ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 5 mM in H₂O betrug.

Es ist zu erkennen, dass alle drei Biradikalpeptide eine höhere Aktivität als nach azider Aufarbeitung aufweisen (Vgl. siehe Abbildung 6-3b). Die ESR-Spektren der reproduzierten

Radikalpeptide **42-44** zeigen im Vergleich zu 3-Carboxy-PROXYL **8** (Referenz-Radikal), dass **42** und **43** ähnlich aktiv sind wie das Monoradikal **8** und **44** eine höhere Aktivität besitzt. Hierbei sollten Biradikal-Peptide die doppelte Fläche der Signale wie die Referenz besitzen, wenn alle Radikale aktiv vorliegen. Die semiquantitative Betrachtung der Integrale ergab, dass tendenziell dies für **44** beobachtet werden konnte, wobei die anderen beiden Radikale **42** und **43** im Gegensatz zur aziden Aufarbeitung zumindest circa die Hälfte der Aktivität wie die Monoradikal-Referenz **8** zeigen (siehe Tabelle 6-6).

Tabelle 6-6: Auflistung der absoluten Integrale (333 bis 340 mT) der ESR-Spektren der Radikalpeptide **42-44** und des Referenz-Monoradikals **8** mit prozentualen Anteil an aktiven Radikalen im Vergleich zum Referenz-Monoradikal **8**.

Verbindung	Integral	Aktive Radikale im Vergleich zum Referenz-Monoradikal [%]
3-Carboxy-PROXYL 8	14514	100
Reproduzierte 42	6729	46,4
Reproduzierte 43	7242	49,9
Reproduzierte 44	19895	137,1

Dies zeigt, dass die Lösungsmittelzusammensetzung für die HPLC-Aufreinigung einen signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Radikale besitzt.

6.1.3. Zusammenfassung und Ausblick für PROXYL-funktionalisierte Peptide

Der Radikal-Aminosäurebaustein **23** konnte erfolgreich in eine Modell-Peptidsequenz eingebaut werden. Hierbei wurde ein Rückgang der Ausbeuten um bis zu einem Drittel der Ausbeute im Vergleich zu einem Referenzpeptid in Abhängigkeit der Radikal-Position im Peptid beobachtet. Nur bei zwei der hergestellten Systeme (siehe **Abbildung 6-14**) wird eine signifikante Aktivität im Vergleich zum Referenz-Monoradikal beobachtet, sodass nur diese beiden Systeme für DNP-Experimente geeignet sind.

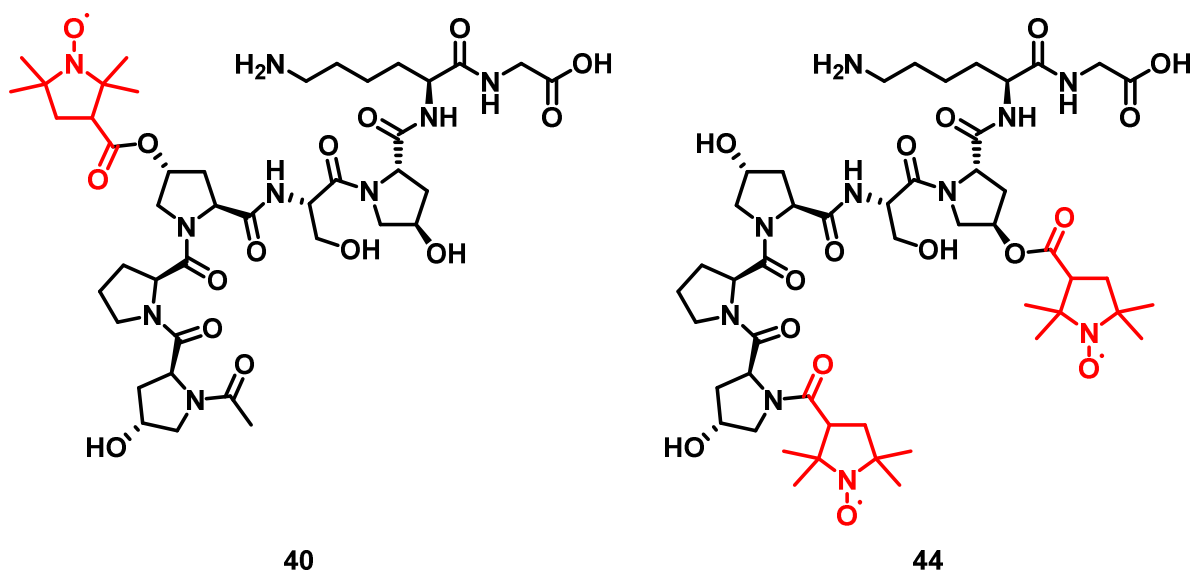


Abbildung 6-14: Darstellung der Strukturen der aktiven Radikal-funktionalisierten Peptide. Das Monoradikal **40** und das Biradikal **44**.

Die DNP-NMR-Messungen an diesen beiden Systemen zeigten Signalverstärkungen von 7 für **40** und 41 für **44** für die Protonen und 10 für **40** und 40 für **44** für die Kohlenstoffe des Glycerins aus der Matrix. Dies führt zu einer drastischen Messzeitreduzierung von 100 Tagen bzw. über 4 Jahren auf einen Tag.

Um zu überprüfen, ob die Radikalpeptide ohne Radikalaktivität reaktiviert werden können, wurden basische Ammoniak-Lösung, Natronlauge, pH-Pufferlösungen und nicht nukleophile Basen (Diisopropylethylamin und Triethylamin) eingesetzt. Diese ermöglichen prinzipiell eine Reaktivierung führen jedoch bei den eingesetzten Konzentrationen zur Zersetzung der Peptide. Schließlich wurden die Biradikal-Peptide reproduziert und TFA als saures Lösungsmittel im Aufreinigungsschritt eliminiert. Dies führte zu aktiven Radikal-Peptiden jedoch mit geringen Ausbeuten. Die hergestellten reproduzierten Biradikal-Peptide stehen für DNP-Experimente zur Verfügung. Sie konnten nicht im Rahmen dieser Arbeit in DNP-Messungen zum Einsatz kommen, die Messungen sind jedoch in Planung, sobald das Messgerät wieder Einsatz bereit ist. Hierbei sollen sie in Distanz-Studien für DNP Polarisationsmittel eingesetzt werden, bei denen die Abhängigkeit der DNP Verstärkung von der Distanz der Radikalzentren untersucht wird.

6.2. Seitenketten-Benzophenon-funktionalisiertes Peptid

Inspiziert von der aus der Literatur^{164-166, 168} bekannten Möglichkeit Aminosäuren wie Tyrosin (Tyr), Histidin (His) und Glycin (Gly) mittels CIDNP zu polarisieren, soll eine Peptidsequenz bestehend aus diesen Aminosäuren und der Benzophenon funktionalisierten Fmoc-Aminosäure als Biradikal-Paar bildendes Farbstoffmolekül, hergestellt werden. Ebenfalls wird ein Peptid ohne Funktionalisierung hergestellt, um als Referenz zu dienen

Hierfür wurde eine nicht natürlich vorkommende Tetrapeptid-Sequenz von NH-His-Glu-Tyr-Gly-OH **46** gewählt, um mit der Glu-Position eine Stelle für die Funktionalisierung zu schaffen, und mit His, Tyr und Gly mehrere Ziele für CIDNP-Experimente bereit zu stellen (siehe Abbildung 6-15).

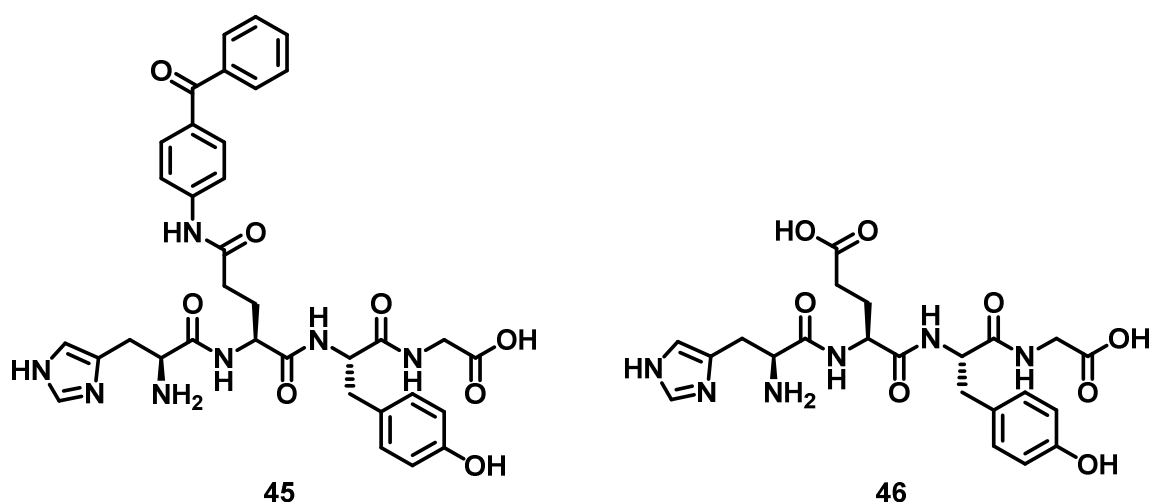


Abbildung 6-15: Darstellung der Tetrapeptid-Verbindung NH₂-His-Glu(NH-Benzophenon)-Tyr-Gly-OH **45** und deren Referenzpeptid ohne Funktionalisierung **46**.

Die Ausbeuten und Reinheiten der Peptide sind in Tabelle 6-7 dargestellt.

Tabelle 6-7: Auflistung der Ausbeuten in Prozent und der Reinheiten (HPLC) in Prozent des mit Benzophenon funktionalisierten Peptides **45** und dessen unfunktionalisierten Referenzpeptides **46**.

Peptidsequenz	Ausbeute [% d. theo. Ausbeute]	Reinheit [%]
NH-His-Glu(NH-Benzophenon)-Tyr-Gly-OH 45	33,7	>99
NH-His-Glu-Tyr-Gly-OH 46	67,9	>99

Die Produkte konnten mit einer Ausbeute von 33,7 % und 67,9 % isoliert werden und mittels HPLC und MS charakterisiert werden (siehe Anhang 12.28 und 12.29). Die Retentionszeiten und detektierten Massen sind in Tabelle 6-8 aufgelistet.

Tabelle 6-8: Retentionszeiten und MS-Daten des mit Benzophenon funktionalisierten Peptides und dessen unfunktionalisierten Referenzpeptides.

Peptidsequenz	t _R [min]	Ionisierung	Masse (beobachtet) [m/z]	Masse (berechnet) [m/z]
45	20,6	[M+H] ⁺	684,3	684,3
46	10,1	[M+H] ⁺	505,2	505,2

Durch den Einbau des funktionalisierten Fmoc-Aminosäurebausteins sank die Ausbeute bei gleichem Material, gleicher Handhabung und verwendeten Chemikalien um die Hälfte im Vergleich zu einer Synthese ohne Funktionalisierung und die Retentionszeit verdoppelte sich. Daraus lässt sich ableiten, dass die Benzophenon Funktionalisierung die SPPS stark beeinflusst und das Peptid weitaus hydrophober werden lässt. Nichts desto trotz konnte die Benzophenon-funktionalisierte Aminosäure erfolgreich in der SPPS verwendet und das Tetrapeptid NH-His-Glu(NH-Benzophenon)-Tyr-Gly-OH **45** hergestellt werden.

Zusammenfassung und Ausblick für Seitenketten-Benzophenon-funktionalisierte Peptide

Durch die erfolgreiche Einführung des Benzophenon funktionalisierten Aminosäurebausteins in eine Tetra-Peptid-Sequenz konnte die Vielseitigkeit unserer Funktionalisierungsstrategie von Fmoc-Aminosäuren bestätigt werden. Die hergestellte Verbindung bietet mit Tyrosin (Tyr), Histidin (His) und Glycin (Gly) die Literatur bekannte Möglichkeit für CIDNP-Experimente.^{164-166, 168} Mit diesem Modellsystem soll in Zukunft die Forschung auf dem Gebiet der Polarisationsübertragung auf das Rückgrat eines Peptides mittels CIDNP in Zusammenarbeit mit dem *Laboratory of Photochemical Radical Reactions* in Nowosibirsk unter Leitung von Alexandra V. Yurkovskaya unterstützt werden.

7. Amino-funktionalisiertes Dispiro-Radikal

Wie bereits im Kapitel 6 gezeigt wurde, ist die Aktivität von Nitroxyl-Radikalen pH-abhängig und kann durch den Einsatz von Säure, z. B. Ascorbinsäure, eingeschränkt werden. Um diese pH-Abhängigkeit von Nitroxyl-Radikalen zu verringern, soll PROXYL durch ein sterisch abgeschirmtes Radikal (veränderte 2,6-Substitutionen) ersetzt werden.²⁰⁹

Diese Abschirmung soll durch das Dispiro-Radikal **47** (15-Amino-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadec-7-yloxy) realisiert werden. Es dient im Allgemeinen als Synthesevorstufe der Biradikale PYPol **49** ((15-[(7-oxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadec-15-yl)carbamoyl]amino)-c-[3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadec-7-yl])oxidanyl) und AMUPol **49** ((15-[(7-oxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadec-15-yl)carbamoyl][2-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ylamino))-[3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadec-7-yl])oxidanyl) (siehe Abbildung 7-1).

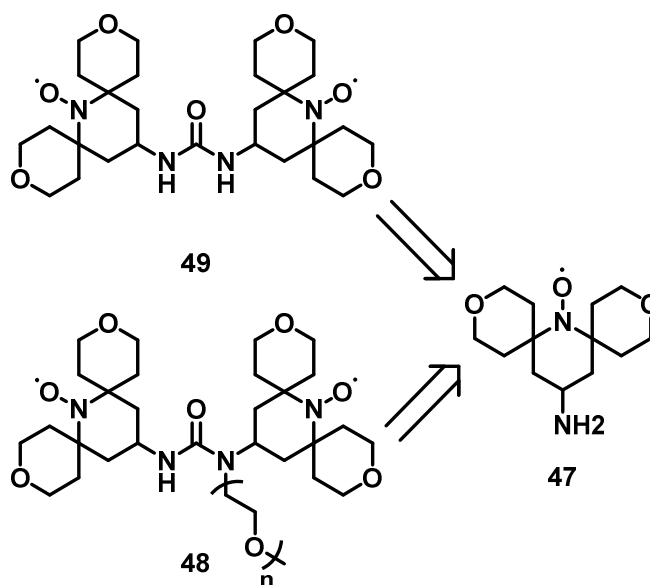
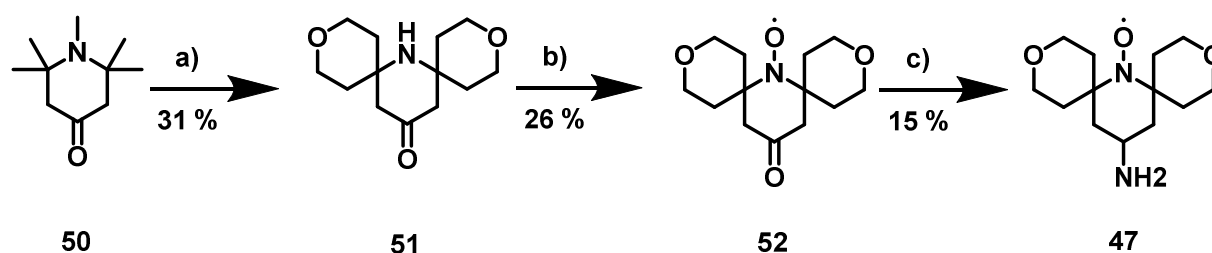


Abbildung 7-1: Retrosynthetische Darstellung der Biradikale PYPol **49** und AMUPol **48** und ihrer Dispiro-Radikal-Synthesevorstufe **47**.

Die Synthese des Dispiro-Radikals **47** wurde über eine dreistufige Synthese erreicht (siehe Abbildung 7-1).



Schema 7-1: Synthese des Dispiro-Radikals **47**. a) Tetrahydro-4*H*-pyran-4-on **53**, NH₄Cl, DMSO(abs.), 60 °C; b) H₂O₂, Na₂WO₄, Ethanol, RT; c) NaBH₃CN, Ammoniumacetat.

Nach einer 2,6-Substitutionsreaktion von **50** mit Tetrahydro-4*H*-pyran-4-on **53** wurde das resultierende Zwischenprodukt **51** direkt in der anschließenden Oxidationsreaktion mit Wasserstoffperoxid und Natriumwolframat als Katalysator zum Radikal **52** umgesetzt. Das erhaltene Radikal **52** wurde säulenchromatographisch aufgereinigt und anschließend durch eine reduktive Aminierung nach BORCH^{210 211} mit Natriumcyanoborhydrid als Reduktionsmittel zum Amino-funktionalisierten Dispiro-Radikal **47** umgesetzt und erneut säulenchromatographisch aufgereinigt.

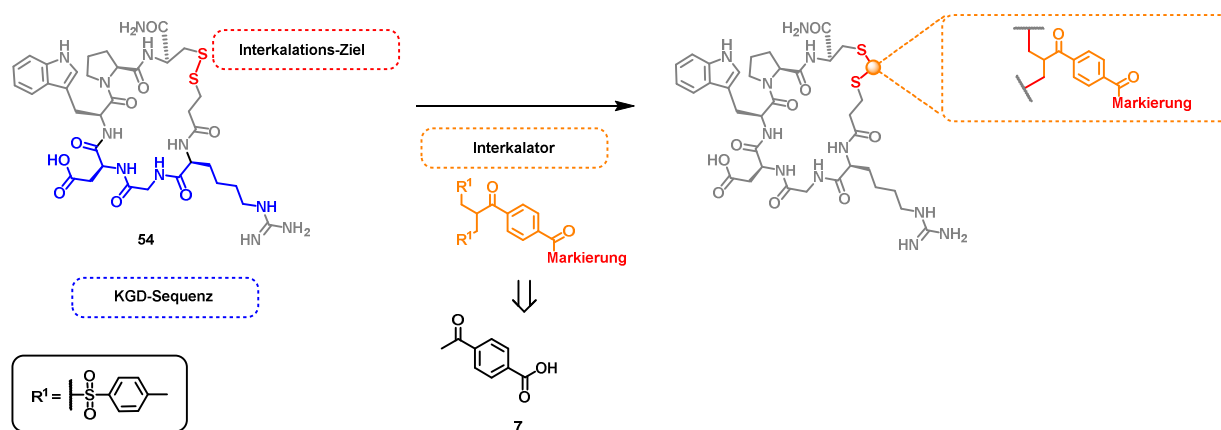
Die hergestellten Produkte und ihre Zwischenstufen wurden mittels NMR, MS und ESR charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.30-12.32).

Zusammenfassung und Ausblick für Amino-funktionalisierte Dispiro-Radikale

Es konnte erfolgreich ein Amino-funktionalisiertes Dispiro-Radikal **47** synthetisiert werden, das in zukünftigen Radikal-Markierungen für mittels SPPS hergestellten Peptiden die pH-Abhängigkeit der Aktivität der Radikal-Peptide eliminieren soll. Das final erhaltene Dispiro-Radikal **47** soll in pH-abhängigen Aktivitätsuntersuchungen analysiert werden und PROXYL als Radikal-Markierung ersetzen.

8. Bissulfon-basierte Markierungen für Interkalationsreaktionen in Disulfidbindungen von Biomolekülen für die Anwendung in DNP- und PHIP-Experimenten

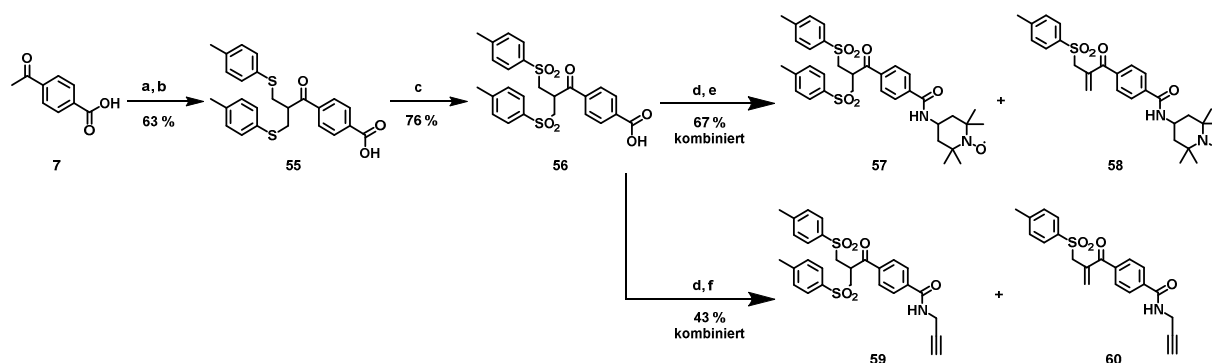
Es soll eine spezifische Bissulfon-basierte Markierungsstrategie für bioaktive Moleküle vorgestellt werden, welche Disulfidbrücken enthalten. Hierfür wurde Eptifibatid **54** als Modellsystem gewählt, das als Thrombozytenaggregationshemmer in der Medizin angewendet wird und eine Disulfidbrücke besitzt. Durch die spezifische Markierung der Disulfidbrücke von Eptifibatid **54** soll dieses bioaktive Molekül für analytische Techniken wie die ESR, DNP- und PHIP-NMR zugänglich gemacht werden. Die Markierung soll synthetisiert und nach Öffnen der Disulfidbrücke des Eptifibatids **54** durch doppelte Michael-Addition, unter physiologischen Bedingungen, in die Disulfidbrücke des Eptifibatids **54** eingebaut werden. (siehe Schema 8-1).



Schema 8-1: Darstellung der zyklischen Struktur und der "KGD-Aminosäuresequenz" ("Lys"-Gly-Asp, in blau) von Eptifibatid **54** sowie Einführung der Bissulfon-basierten Markierung in die reduzierte Disulfidbindung, um das markierte Eptifibatid zu erhalten. Hier wird die übliche Nomenklatur des Bindungsmotivs verwendet, obwohl es statt KGD homoRGD lauten sollte.²¹²⁻²¹⁴

8.1. Bissulfon-basierte Radikal- und Allyl-Markierungen

Mit Ausnahme des letzten Reaktionsschrittes wurden die einzelnen Syntheseschritte analog zur Literatur¹⁹⁵ in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Reggelin durchgeführt (siehe Schema 8-2).

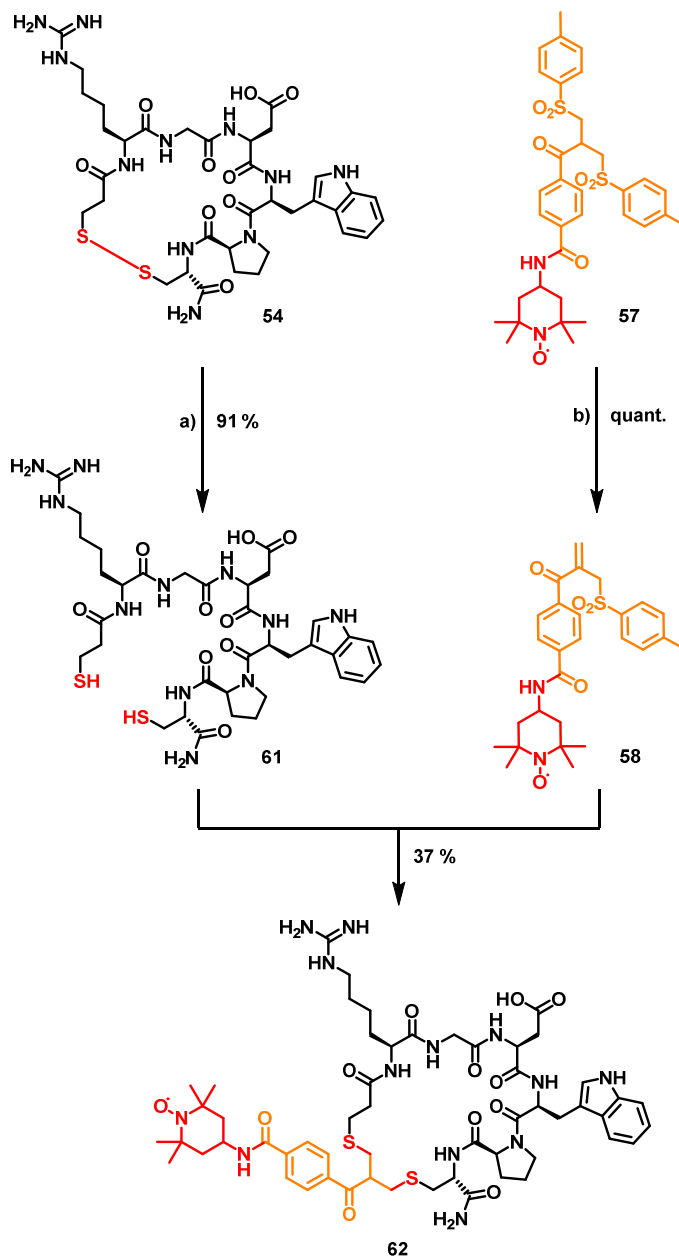


Schema 8-2: Darstellung der Synthese der Interkalator-Mischung von **57** und **58** bzw. **59** und **60**. a) Paraformaldehyd, Dimethylamin Hydrochlorid, Isopropanol, Reflux, 24 h; b) 4-Methylthiophenol, Isopropanol/H₂O, RT, 24 h; c) H₂O₂, AcOH, 30 °C, 24 h; d) EDC-HCl, HOBT, CH₂Cl₂ / *N*-Methylmorpholin, 0 °C, 0,5 h; e) 4-Amino-TEMPO, CH₂Cl₂ / *N*-Methylmorpholin, 0 °C, 24 h, f) Propargylamin, CH₂Cl₂ / *N*-Methylmorpholin, 0 °C, 24 h.²¹²

Nach einer doppelten MANNICH-Reaktion wurde das resultierende Zwischenprodukt direkt in der anschließenden Substitutionsreaktion mit 4-Methylthiophenol umgesetzt, was nach einer Umkristallisation den Bisthioether **55** mit einer Ausbeute von 63 % ergab. Die Oxidation von **55** wurde mit H₂O₂ in Essigsäure erreicht. Dadurch wurde die bissulfonylierte Säure **56** erhalten. Über eine EDC-vermittelte Amid-Kopplung mit 4-Amino-TEMPO/Propargylamin und anschließender säulenchromatographischen Aufreinigung wurden die Produkte als Gemisch aus Bissulfon **57** und Allylsulfon **58** bzw. **59** und **60** erhalten. Die hergestellten Produkte und ihre Zwischenstufen wurden mittels NMR und abschließend zusätzlich mittels HPLC sowie HPLC-MS und für das Gemisch **57** und **58** mittels ESR charakterisiert (siehe Anhang, Kapitel 12.33-12.36). Die Markierungen wurden anschließend in einer Interkalationsreaktion in das bioaktive Molekül Eptifibatid eingebaut, was in den folgenden Abschnitten beschrieben wird.

8.2. Bissulfon-basierte Radikal-Markierung von Eptifibatid

Nach erfolgreicher Herstellung der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung **57** soll die Interkalationsreaktion in die Disulfidbrücke von Eptifibatid **54** realisiert werden. Der dazu notwendige zweistufige Prozess ist in Schema 8-3 dargestellt.



Schema 8-3: Darstellung der Interkalationsreaktion der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung **57** in die Disulfidbindung von Eptifibatid **54**. a) Dithiothreitol **63**, MeCN:H₂O 1:1 (v/v), RT, 20 h; b) MeCN:H₂O 1:1 (v/v), pH = 7,8 (NaH₂PO₄), RT, 24 h; c) MeCN:H₂O 1:1 (v/v), pH = 7,8 (NaH₂PO₄), RT, 24 h.²¹²

Zunächst wird Eptifibatid **54** durch Dithiothreitol **63** (DTT) reduziert, um die Disulfidbindung zu öffnen²¹⁵, wodurch das Bismercaptan **61** entsteht. Nach dessen Aufreinigung durch

semipräparative HPLC wird es in der folgenden Interkalationsreaktion eingesetzt. Dazu wird **61** mit Allylsulfon **58** versetzt, das aus seinem Gemisch mit Bissulfon **57** durch milde basische Bedingungen hergestellt wurde. Die doppelte MICHAEL-Reaktion liefert nach semipräparativer HPLC das Produkt **62** mit 37 % Ausbeute.

Die kovalente Insertion der Radikal-Markierung wird durch ESI-MS und HPLC bestätigt (siehe Anhang, Kapitel 12.38). Der Interkalationsprozess kann durch Vergleich der HPLC-Signale für jeden Schritt verfolgt werden (Abbildung 8-1) und wird durch das aufgenommene Massenspektrum des final isolierten markierten Produktes **62** bestätigt (siehe Anhang, Kapitel 12.38).

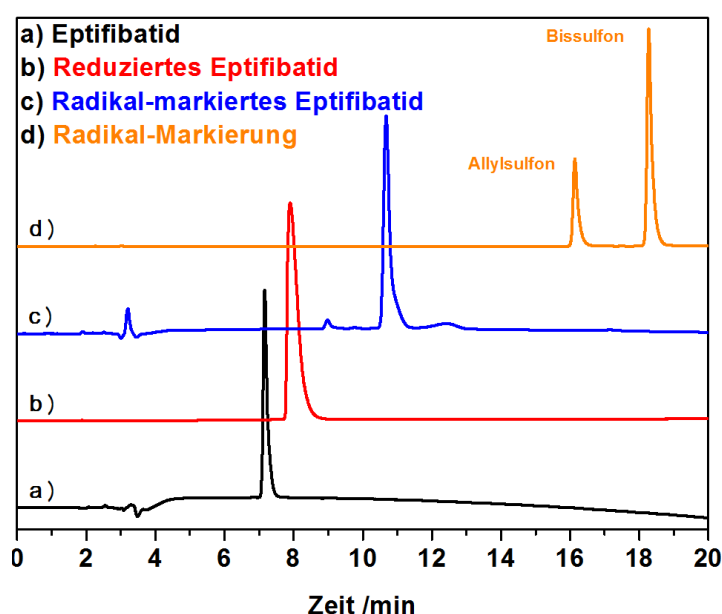
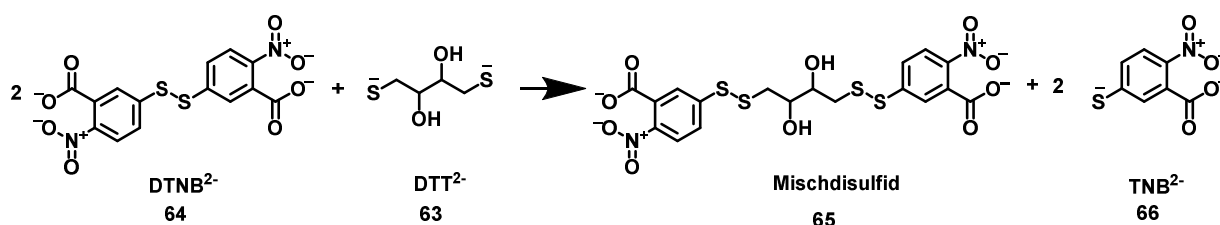


Abbildung 8-1: Darstellung der HPLC-Signale des Interkalationsprozesses bei 214 nm, mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA über 20 Minuten (a) Eptifibatid **54**, (b) reduziertes Eptifibatid **61**, (c) Radikal-markiertes Eptifibatid **62**, (d) Mischung der Radikal-Markierungen **57** und **58**.²¹²

Die HPLC-Signale der Radikal-Markierungs-Mischung zeigt die Verbindungen von Bissulfon **57** ($t_R = 18,3$ min) und Allylsulfon **58** ($t_R = 16,1$ min) (Abbildung 8-1d). Die Mischung der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung wurde durch HPLC-MS validiert (siehe Anhang, Kapitel 12.35). Der Interkalationsprozess kann eindeutig durch den Vergleich der HPLC-Signale verfolgt werden: Eptifibatid **54** mit $t_R = 7,2$ min, reduziertes Eptifibatid **61** mit $t_R = 7,9$ min und markiertes Eptifibatid **62** mit $t_R = 10,7$ min (Abbildung 8-1, a-c). Das Signal bei $t_R = 10,7$ min konnte zusätzlich mittels ESI-MS eindeutig dem Radikal-markierten Eptifibatid **62** zugeordnet werden (siehe Anhang, Kapitel 12.38). Hierbei sind für **54** die Massen von $m/z = 1175$ und $m/z = 588$ zu beobachten, welche eindeutig auf die Radikal-markierten Eptifibatid-Molekülmassen $[M+H]^+$ und $[M+2H]^{2+}$ hinweisen.

Da im HPLC-Chromatogramm des Radikal-markierten Eptifibatids **62** (Abbildung 8-1c) nur ein Hauptsignal und kein Signal der reduzierten Form **61** (Abbildung 8-1b) und der nicht-reduzierten Form **54** (Abbildung 8-1a) des Eptifibatids zu erkennen ist, können diese beiden Moleküle ausgeschlossen werden. Die Analyse der Produktfraktion mittels ESI-MS (siehe Anhang, Kapitel 12.38) bestätigt die Bindung der Radikal-Markierung an Eptifibatid. Allerdings kann anhand dieser Informationen nicht eindeutig bewiesen werden, ob die Bindungs-Brücke wieder geschlossen wurde oder nicht, da sowohl die Radikalmarkierung einfach an ein Cystein als auch zweifach zur Ausbildung der Bindungsbrücke die gleiche Masse von $m/z = 1175,5$ haben. Diesbezüglich wurde ein Ellmans-Test durchgeführt, der freie Thiolgruppen nachweist. Laut Literatur²¹⁶⁻²¹⁸ kann dieses Verfahren zur Quantifizierung von freien Thiolen verwendet werden, indem ein Standard, wie z. B. Dithiothreitol **63** (DTT), mit Ellmans-Reagenz **64** (5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure), DTNB) versetzt wird, um eine Kalibrierung zu erreichen. **64** ist eine vielseitig wasserlösliche Verbindung zur Quantifizierung freier Thiol-Gruppen in Lösung. Eine Lösung dieser Verbindung erzeugt ein gelb gefärbtes Produkt, wenn sie mit freien Thiol-Gruppen reagiert, welches ein UV-messbares Absorptionsmaximum bei 412 nm besitzt. Folglich ist das Ellman-Reagenz aufgrund seiner Spezifität als Assay-Reagenz für Thiol-Gruppen bei neutralem pH-Wert sehr nützlich (siehe Schema 8-4).



Schema 8-4: Reduktionsreaktion von Ellmans-Reagenz **64** (DTNB,) mit Dithiothreitol **63** (DTT) zum Mischdisulfid **65** und 2-Nitro-5-thiobenzoensäure **66** (TNB).²¹²

DTNB **64** reagiert mit freien Thiol-Gruppen unter Bildung von Mischdisulfiden und 2-Nitro-5-thiobenzoensäure **66** (TNB). Hierbei liegt der molare Extinktionskoeffizient von TNB bei einem Wert von $14,150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 412 nm.²¹⁶⁻²¹⁸ Die Extinktion von TNB wird durch Änderungen des pH-Wertes zwischen 7,6 und 8 nicht beeinflusst. Des Weiteren kann neben der Verwendung des Literaturwertes des Extinktionskoeffizienten eine Kalibrierung erstellt werden. Indem bekannte Konzentrationen von Thiolgruppen, wie z. B. DTT **63** verwendet werden und ihre Absorption per UV-Vis detektiert wird (Abbildung 8-2a), kann diese Kalibrierung durchgeführt werden (Abbildung 8-2b).

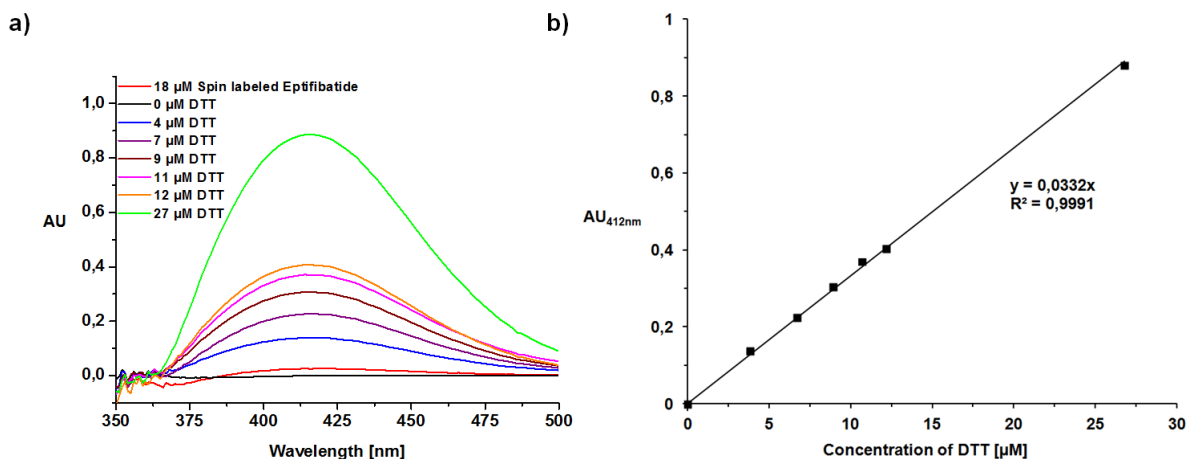


Abbildung 8-2: a) Absorptionen bekannter Konzentrationen von Dithiothreitol **63** (DTT) und markiertem Eptifibatid **62** nach Reduktionsreaktion mit Ellmans-Reagenz (DTNB). b) Kalibriergerade durch lineare Regression der gemessenen Absorptionen der bekannten Konzentrationen von DTT nach der Reduktionsreaktion mit Ellmans-Reagenz (DTNB). Die Auswertung erfolgte für das Absorptionsmaximum bei 412 nm.²¹²

Die erfolgreiche Insertion der Markierung in die Thiolgruppen wird durch eine geringe Thiolkonzentration ($\leq 10\%$) bestätigt (siehe Tabelle 8-1).

Tabelle 8-1: Ergebnisse der Thiolkonzentration von 18 µM Radikal-markierten Eptifibatid **62** unter Verwendung der Kalibriergeraden bekannter Konzentrationen von DTT **63** und unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten von TNB **66** gemäß der Literatur.²¹⁶⁻²¹⁸

Methode	Extinktionskoeffizient von TNB bei 412 nm [$M^{-1}cm^{-1}$]	Thiol-Konzentration von 18 µM Eptifibatid [µM]
Experimentelle Kalibriergerade	16,617	1,5 (8 % der Gesamtkonzentration)
Kalibriergerade der Literatur	14,150	1,8 (10 % der Gesamtkonzentration)

Daraus folgt, dass mindestens 90 % der Eptifibatid-Moleküle mit Radikal-markiert sind, da in diesen Molekülen keine Thiolgruppen vorhanden sind und sich folglich Brücken über Thioether gebildet haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Bissulfon-basierte Radikal-Markierung **57** als Mischung mit ihrem reaktiven Eliminationsprodukt **58** synthetisiert wurde und diese Mischung erfolgreich zur Markierung des zyklischen Heptapeptids Eptifibatid **54** durch ortsselektive Einfügung eingesetzt wurde.

Der Nachweis der Radikal-Aktivität nach der Interkalationsreaktion wurde für **62** mittels ESR-Messung validiert, um seinen radikalischen Charakter als Voraussetzung für die beabsichtigten DNP-Messungen zu verifizieren (Abbildung 8-3).

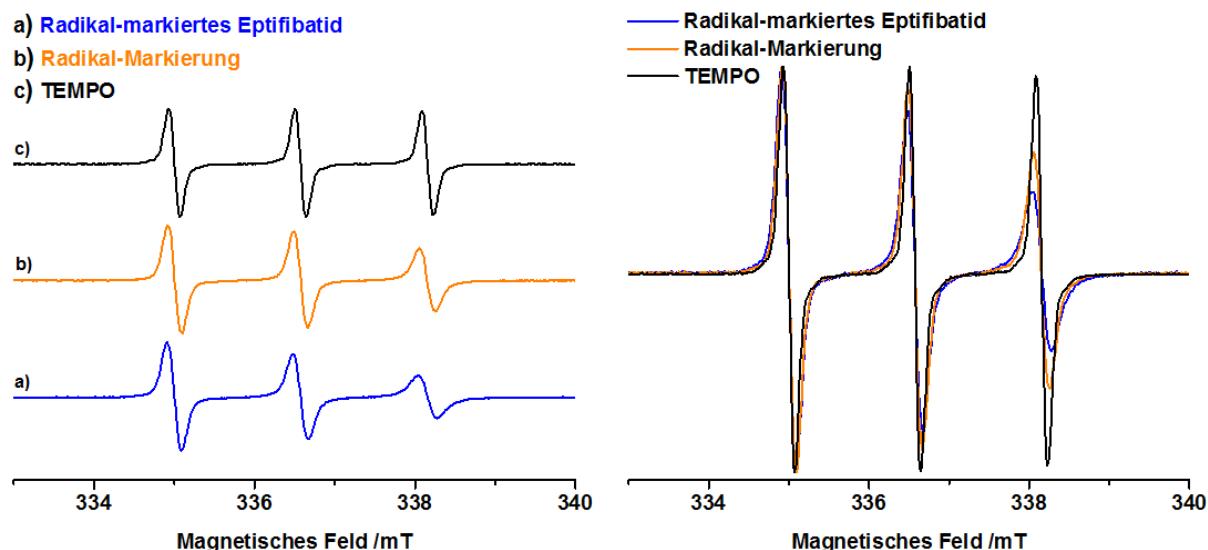


Abbildung 8-3: ESR-Spektren von a) Radikal-markiertem Eptifibatid **62** (blau), b) einer Mischung der Radikal-Markierungen **57** und **58** (orange) und c) von TEMPO als Referenz (schwarz). Spektren normalisiert auf die maximale Intensität (links). Spektren mit Originalintensität ohne Normalisierung (rechts). Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch. Die Proben wurden bei Konzentrationen von 1 mM in DMSO bei 293 K gemessen.²¹²

Die ESR-Spektren des markierten Eptifibatids **62** der Radikal-Markierungs-Mischung **57/58** und TEMPO **67** (2,2,6,6-Tetramethylpiperidinyloxy) als Referenz zeigen das erwartete Triplettsignal, das durch Hyperfeinwechselwirkung zwischen dem ungepaarten Elektronenspin und ^{14}N -Stickstoff ($S = 1$) verursacht wird, wie es für Nitroxyl-Radikale typisch ist.²⁰ Obwohl eine absolute Quantifizierung der Signale mit diesen Experimenten nicht möglich ist, wurde eine semiquantitative relative Analyse durch Integration der Spektren durchgeführt. Dabei wurden die absoluten Integrale von TEMPO, der Bissulfon-Radikal-Markierung und dem Radikal-markierten Eptifibatid verglichen und das Integral von TEMPO als Referenz für 100 % Aktivität verwendet. Daraus ergibt sich eine relative Aktivität von 90 % für die Bissulfon-Radikal-Markierung bzw. 79 % für das Radikal-markierte Eptifibatid.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde als nächstes die DNP-Aktivität des Radikal-markierten Eptifibatids **62** untersucht. So wurden ^1H -MAS-NMR- (Abbildung 8-4a) und $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR-Spektren (Abbildung 8-4b) aufgenommen, um die Effizienz des Polarisationstransfers für DNP-Anwendungen zu zeigen. Ein Vergleich der Spektren zeigt die ^1H -MAS-Spektren (Abbildung 8-4a) mit Mikrowellenbestrahlung (MW On) und ohne

Mikrowellenbestrahlung (MW Off), so wird festgestellt, dass die Signale unter MW-Bestrahlung im Vergleich zum "MW Off"-Spektrum um den Faktor 14 verstärkt sind.

Eine ähnliche Signalverstärkung wird im $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CP MAS NMR-Spektrum dieser Probe für die Signale der Kohlenstoffe des Glycerins bei 60,7 und 70,5 ppm beobachtet. Beide Signale sind um den Faktor 19 verstärkt (Abbildung 8-4b), was einer Messzeitreduzierung um den Faktor 361 entspricht. Das bedeutet, dass die Verwendung dieser Radikal-Markierung in der Festkörper-DNP-Analytik die Messzeit im Vergleich zur Standard-Festkörper-NMR von einem Jahr auf etwa einen Tag reduziert. Die vermeintliche Diskrepanz zwischen der Signalverstärkung von ^1H - zu $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR hängt höchstwahrscheinlich von dem inhärenten Hintergrundsignal der Protonen ab, die nicht polarisiert sind.²¹⁹

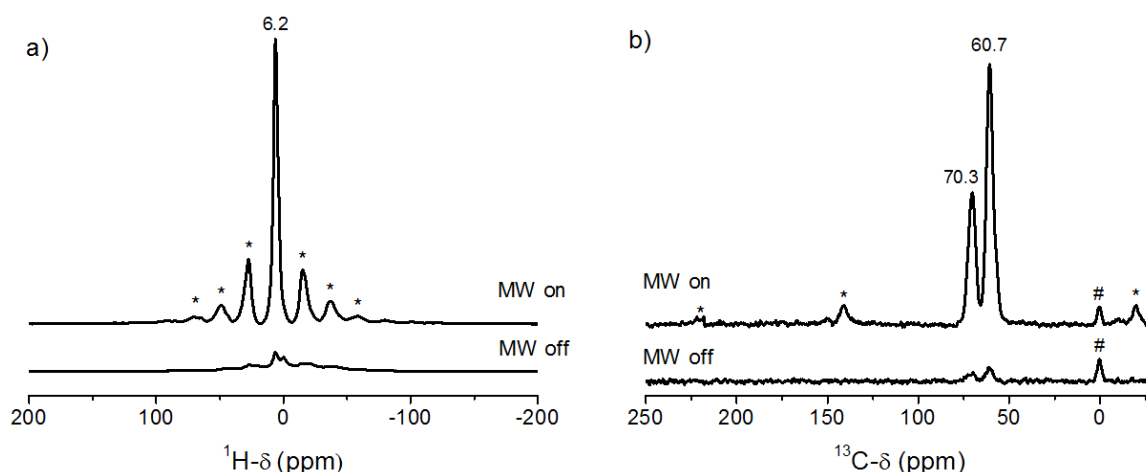
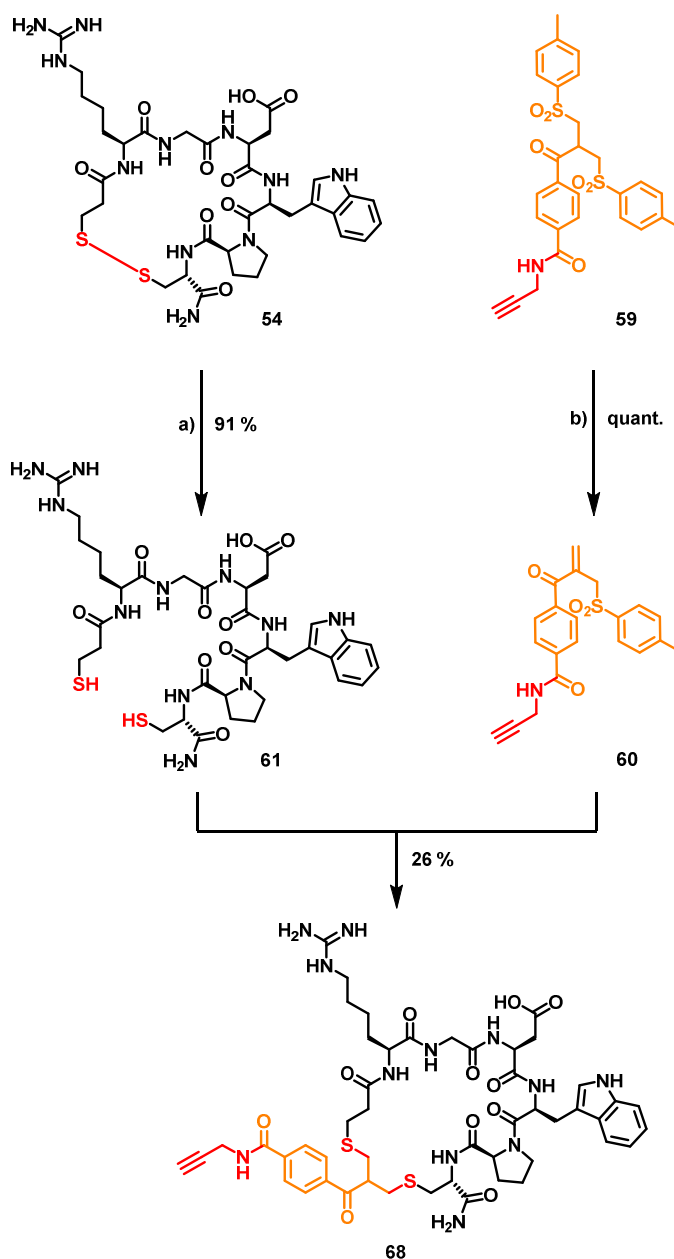


Abbildung 8-4: ^1H - (a) und $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR-Spektren (b) von 15 mM Radikal-markierten Eptifibatid **62** in einer Glycerin- d_8 / D_2O / H_2O -Matrix mit (MW on) und ohne (MW off) Mikrowellenbestrahlung, gemessen bei 9,4 Tesla mit 8 kHz Spinnrate. Hinweis: In den ^{13}C -Spektren beziehen sich die beiden Signale bei 60,7 ppm und 70,5 ppm auf das Glycerin. Die mit # gekennzeichneten Signale bei 0 ppm sind den Methylkohlenstoffen des Siliconstopfens zuzuordnen, welcher zum Einschluss der Flüssigkeit im NMR-Rotor verwendet wurde. Die Sternchen zeigen die Spinning-Seitenbänder des Glycerins in den ^{13}C -Spektren und die Spinning-Seitenbänder des Wassers in den ^1H -Spektren.²¹²

Das Signal des Eptifibatids ist im Spektrum nicht nachweisbar, dies liegt höchstwahrscheinlich an der geringen Konzentration (ca. 15 mM), die etwa 550-mal kleiner ist als die Konzentration von Glycerin- d_8 (8,2 M) in der DNP-Matrix. Außerdem sind aufgrund der relativ geringen Größe des Eptifibatids durch Signalauslöschungen möglicherweise nur die ^{13}C -Kerne des Glycerins im Spektrum sichtbar. Dieses Phänomen wurde bereits auch für andere Nitroxidradikal-Systeme, die in DNP-NMR-Experimenten²⁰⁶⁻²⁰⁷ verwendet wurden, sowie für Radikal-Markierungen in Proteinsystemen²⁰⁸ ausführlich beschrieben.

8.3. Bissulfon-basierte Alkyl-Markierung von Eptifibatid

Nach erfolgreicher Herstellung der Bissulfon-basierten PHIP-Markierung **59** soll die Interkalationsreaktion in die Disulfidbrücke von Eptifibatid **54** realisiert werden. Der dazu notwendige zweistufige Prozess ist in Schema 8-5 dargestellt.



Schema 8-5: Darstellung der Interkalationsreaktion der Bissulfon-basierten PHIP-Markierung **59** in die Disulfidbindung von Eptifibatid **54**. a) Dithiothreitol **63**, MeCN:H₂O 1:1 (v/v), RT, 20 h; b) MeCN:H₂O 1:1 (v/v), pH = 7.8 (NaH₂PO₄), RT, 24 h; c) MeCN:H₂O 1:1 (v/v), pH = 7.8 (NaH₂PO₄), RT, 24 h.

Zunächst wird Eptifibatid **54** durch Dithiothreitol **63** (DTT) reduziert, um die Disulfidbindung zu öffnen,²¹⁵ wodurch das Bismercaptan **61** entsteht. Nach dessen Aufreinigung durch

semipräparative HPLC wird es in der folgenden Interkalationsreaktion eingesetzt. Dazu wird **61** mit Allylsulfon **60** versetzt, das aus einem Gemisch mit Bissulfon **59** unter milden basischen Bedingungen hergestellt wurde. Die doppelte MICHAEL-Reaktion verläuft erwartungsgemäß und liefert nach semipräparativer HPLC das Produkt **68** mit 26 % Ausbeute.

Die kovalente Insertion der Allyl-Markierung wird durch ESI-MS und HPLC bestätigt (siehe Anhang, Kapitel 12.39). Der Interkalationsprozess kann durch Vergleich der HPLC-Signale für jeden Schritt verfolgt werden (siehe Abbildung 8-5) und wird durch das aufgenommene Massenspektrum des final isolierten Produktes **58** bestätigt (siehe Anhang, Kapitel 12.39).

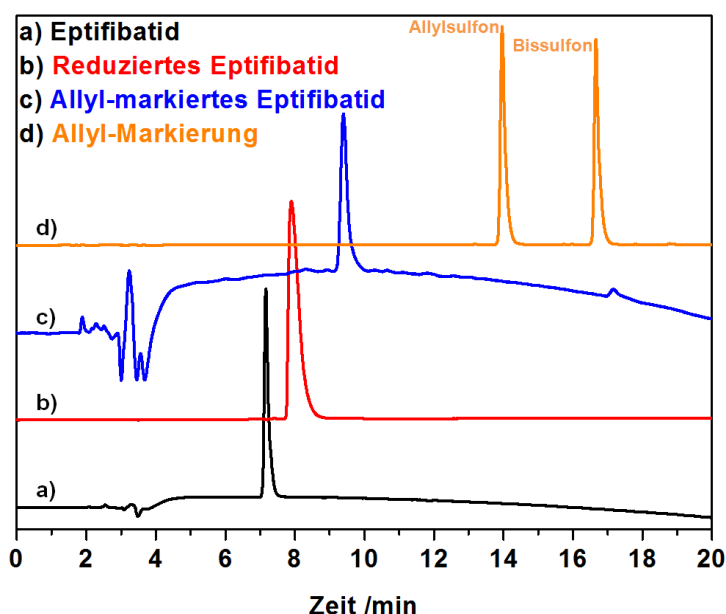


Abbildung 8-5: Darstellung der HPLC-Signale des Interkalationsprozesses bei 214 nm, mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA über 20 Minuten (a) Eptifibatid **54**, (b) reduziertes Eptifibatid **61**, (c) PHIP markiertes Eptifibatid **68**, (d) Mischung der Allyl-Markierungen **59** und **60**.

Die HPLC-Signale der Radikal-Markierungs-Mischung zeigt die Mischung der Verbindungen von Bissulfon **59** ($t_R=16,7$ min) und Allylsulfon **60** ($t_R=14,0$ min) (Abbildung 8-1d). Diese Koexistenz der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung und seiner aktivierten Spezies wurde durch HPLC-MS validiert (siehe Anhang, Kapitel 12.36). Der Interkalationsprozess kann eindeutig durch den Vergleich der HPLC-Signale verfolgt werden: Eptifibatid **54** mit $t_R=7,2$ min, reduziertes Eptifibatid **61** mit $t_R=7,9$ min und markiertes Eptifibatid **68** mit $t_R=9,4$ min (Abbildung 8-1, a-c).

Das Signal bei $t_R = 9,4$ min konnte zusätzlich mittels ESI-MS eindeutig dem Allyl-markierten Eptifibatid **68** zugeordnet werden (siehe Anhang, Kapitel 12.39). Hierbei sind für **68** die

Massen von $m/z = 1059,4$ und $m/z = 530,2$ zu beobachten, welche eindeutig auf die Allyl-markierten Eptifibatid-Molekülmassen $[M+H]^+$ und $[M+2H]^{2+}$ hinweisen.

Zusammenfassend konnte eine Bissulfon-basierte Allyl-Markierung **59** als Mischung mit ihrem reaktiven Eliminationsprodukt **60** erfolgreich zur Markierung des zyklischen Heptapeptids Eptifibatid eingesetzt werden und die ortsselektive Einfügung der PHIP-Markierung in seine Disulfidbrücke validiert werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die PHIP-Aktivität des Allyl-markierten Eptifibatids **68** untersucht. So wurden ^1H -NMR-Spektren aufgenommen, um die Effizienz des Polarisationstransfers für PHIP-Anwendungen zu untersuchen. Die ^1H -Spektren des PHIP-Experiments von **68** sind in Abbildung 8-6 dargestellt.

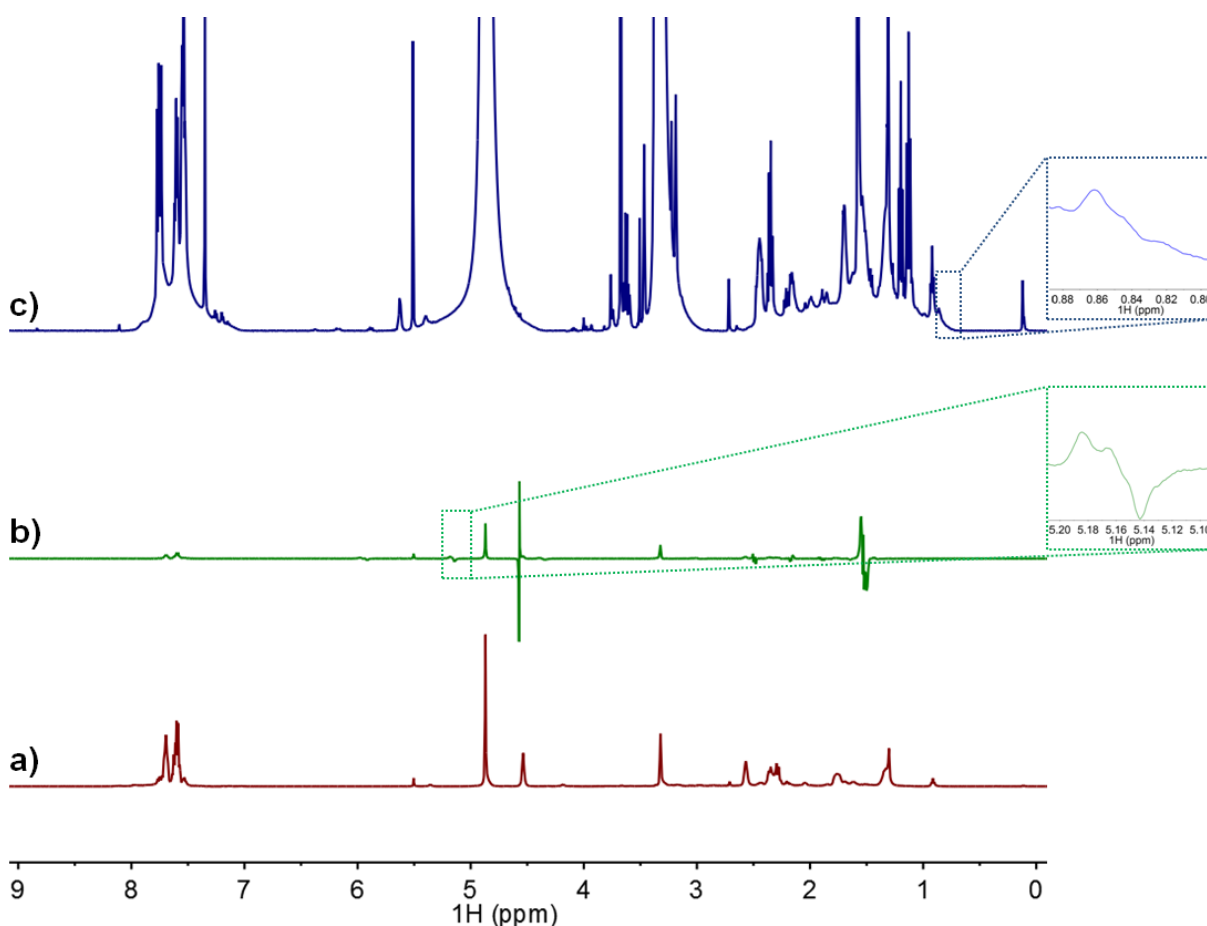


Abbildung 8-6: a) ^1H NMR-Spektrum bei 300 MHz von **68** und $\text{Rh}(\text{dppb})(\text{COD})\text{BF}_4$ in Methanol-d_4 (Hintergrundspektrum mit 64 Scans). b) 10s nach Beginn der Hydrierung mit Parawasserstoff angereicherten Wasserstoffgas (PHIP-Spektrum mit 1 Scan, 500-fach vergrößert). c) 60 s nach Hydrierung mit Parawasserstoff angereicherten Wasserstoffgas (Relaxiertes Spektrum, 4096 Scans).

Abbildung 8-4 zeigt das Hintergrundspektrum (a) sowie das PHIP-Spektrum (b) und das thermisch relaxierte Spektrum (c) von **68** in Methanol-d_4 mit Rhodium-Katalysator ([1,4-Bis(diphenylphosphino)butan](1,5-cyclooctadien)rhodium(I)tetrafluoroborat,

Rh(dppb)(COD)BF_4). Hierbei ist das PHIP-Spektrum mit einer 1-Scan-Messung bei einer Empfängerverstärkung von 0,98 gemessen worden. Für das relaxierte Spektrum wurden 4096 Scans mit einer Empfängerverstärkung von 322 benötigt, um einen sichtbaren und auswertbaren Anteil des Integrals zu erhalten, um durch Vergleich mit dem PHIP-Spektrum den Verstärkungsfaktor zu berechnen. Hierbei konnte ein Verstärkungsfaktor von 445 für die resultierte Alkylgruppe bestimmt werden, die mit dem angereicherten Parawasserstoff generiert wurde. Es wird deutlich, dass ein relaxiertes Spektrum benötigt wird, um eine Relation der hyperpolarisierten und thermischen Spektren zu erhalten. Für die Berechnung wurde das PHIP-Spektrum, nach Normierung auf Empfängerverstärkung und Anzahl an Scans, mit dem thermischen Spektrum nach der Reaktion verglichen.

8.4. Zusammenfassung und Ausblick für Bissulfon-basierte Markierungen

Es wurden zwei neue ortsselektive Markierungen auf Bissulfon-Basis synthetisiert und deren Eignung für die Einführung durch Insertion in die Disulfidbrücke eines bioaktiven Moleküls nachgewiesen.

Der Amino-TEMPO als auch der Allyl-modifizierte Interkalator wurde als Zweikomponentengemisch aus den Bissulfonen **57/59** und deren Eliminierungsprodukten **58/60** erhalten, wobei jeweils beide Komponenten an der Markierungsreaktion teilnehmen können, da die aktiven MICHAEL-Akzeptoren **58/60** unter den Reaktionsbedingungen durch Eliminierung entstehen. Als Beispiel für die Durchführbarkeit des Interkalationsverfahrens wurden die Markierungen in die Disulfidbrücke von Eptifibatid **54**, einem synthetischen zyklischen Heptapeptid, das von einem Desintegrin-Protein aus dem Gift der Klapperschlange *Sistrurus miliarius barbourin* abgeleitet ist, eingebaut.

Die Erhaltung der Aktivität der Radikalmarkierung nach dem Einbau in die Disulfidbindung des Eptifibatids wurde durch ESR-Spektroskopie bestätigt. Angesichts der reduktiven Bedingungen, die für den Einbau der Radikalmarkierung in die Disulfidbrücke notwendig sind (DTT-Reduktion), ist dies ein wichtiges Ergebnis.²²⁰ Schließlich wurden DNP-NMR-Messungen erfolgreich für das Radikal-markierte Eptifibatid **62** durchgeführt, was zu DNP-Signalverstärkungen von 14 für die Protonen und 19 für die Kohlenstoffe des Glycerins aus der Matrix führte, was einer Messzeitreduktion von bis zu 361 führt. Während für das niedermolekulare Eptifibatid **54**, das hier zur Demonstration der prinzipiellen Machbarkeit des Einfügens von Radikal-Markierungen in S-S-Bindungen verwendet wurde, nur die hyperpolarisierten ^{13}C -Kerne der Matrix in den ^{13}C -NMR-Spektren aufgelöst wurden, ist auszugehen, dass auch die ^1H - und ^{13}C -Kerne größerer Bindungspartner wie z. B. des

aktivierten Thrombozyten-Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptors in Bindungsstudien beobachtet werden können.^{208, 221}

PHIP-Experimente zeigten den erfolgreichen Transfer des Parawasserstoffs-angereicherten Wasserstoffgases durch Hydrierungsreaktion auf das Zielmolekül **68**. Hierbei konnte ein Verstärkungsfaktor von 445 bestimmt werden. Dies zeigt, dass eine solche Allyl-Markierung erfolgreich für PHIP-Anwendungen in Biomolekülen verwendet werden kann.

Diese Ergebnisse ebnen den Weg zur Entwicklung und Anwendung leistungsfähiger Werkzeuge für die Einführung ortsspezifischer Markierungen in Biomoleküle, für Strukturuntersuchungen unter Verwendung von PHIP-NMR, Festkörper-DNP oder fortgeschrittenen ESR-Techniken.



9. Zusammenfassung und Ausblick

Die Funktionalisierung von Fmoc-Aminosäuren durch Markierungen an ihren Seitenketten konnte erfolgreich für PROXYL, TOTAPOL und Benzophenon realisiert werden.

Die Fmoc-Aminosäuren Hydroxyprolin **12** (Hyp), Serin **13** (Ser) und Tyrosin **14** (Tyr) konnten in drei Reaktionsschritten an ihrer Hydroxyl-Seitenkette mit dem Monoradikal 3-Carboxy-PROXYL **8** markiert werden. Die synthetisierten Bausteine zeigten Aktivität der Nitroxylspezies in ESR-Messungen. Die fertigen Bausteine sind N-terminal durch eine Fmoc-Schutzgruppe geschützt und C-terminal für Kopplungsreaktionen zugänglich. Der vorgestellte Ansatz ermöglicht die Synthese von Aminosäuren mit Radikalmarkierung in den Seitenketten, die auch unter den in der SPPS auftretenden, sauren Bedingungen radikalische Aktivität und chemische Stabilität zeigen. Dies ermöglicht die Verwendung dieser Bausteine in der Festphasen-Peptidsynthese, um in Zukunft biologische Moleküle spezifisch mit einer Radikal-Markierung herzustellen oder Peptid basierende Radikale für DNP-NMR-Anwendungen zu erzeugen. Schließlich ist diese universelle Radikal-Markierungsstrategie für eine Vielzahl von Aminosäuren verfügbar, die eine Hydroxylgruppe an ihrer Seitenkette aufweisen.

Die mit *tert*-Butyl C-terminal geschützte Fmoc-Aminosäure Glutaminsäure **31** (Glu) konnte ebenfalls in drei Reaktionsschritten in adaptierter Form der PROXYL Funktionalisierung mit Boc geschütztem TOTAPOL **29** an dessen Carboxy-Seitenkette mit diesem BiRadikal-markiert werden. Der synthetisierte Baustein **33** zeigte ebenfalls Aktivität der Nitroxylspezies in ESR-Messungen. Der fertige Baustein ist N-terminal durch eine Fmoc-Schutzgruppe geschützt und C-terminal für Kopplungsreaktionen zugänglich. Der vorgestellte Ansatz zeigt, dass die Synthese von Aminosäuren mit Biradikalmarkierung in den Seitenketten ähnlich zu dem vorgestellten Ansatz der Monoradikal-Funktionalisierung funktioniert. Die Aktivität der Radikale und chemische Stabilität bleibt auch unter stark sauren Bedingungen erhalten. Dies ermöglicht die Verwendung dieser Bausteine in der Festphasen-Peptidsynthese, um biologische Moleküle spezifisch mit einer Biradikal-Markierung, zum Beispiel für DNP-NMR-Anwendungen, zu erzeugen.

Die mit *tert*-Butyl C-terminal geschützte Fmoc-Aminosäure Glutaminsäure **31** (Glu) konnte in ähnlicher Form analog zur TOTAPOL, bzw. PROXYL-Funktionalisierung in einer Zwei-Stufen-Reaktion auch mit 3-Amino-Benzophenon **34** umgesetzt werden. Hierbei wird die Carboxy-Seitenkette markiert. Der synthetisierte Benzophenon-markierte Aminosäure-Baustein **36** konnte durch HPLC, ESI-MS und NMR Analytik nachgewiesen werden. Der fertige Baustein ist N-terminal durch eine Fmoc-Schutzgruppe geschützt und C-terminal für Kopplungsreaktionen zugänglich. Der vorgestellte Ansatz ermöglicht die Synthese von

Aminosäuren mit Benzophenon-Markierung in der Seitenkette, die auch unter den in SPPS auftretenden sauren Bedingungen chemische Stabilität aufweisen. Dies zeigt die Übertragbarkeit der zuvor für Monoradikale vorgestellten Synthesestrategie für die Herstellung von Bausteinen für eine spezifische Benzophenon-Markierung von biologisch relevanten Molekülen über Festphasen-Peptidsynthese. Diese hat ein großes Anwendungspotential um in Zukunft biologisch relevante Moleküle für CIDNP-NMR-Anwendungen zugänglich zu machen.

Der hergestellte Fmoc-Hydroxyprolin basierende Monoradikal-Aminosäurebaustein **23** konnte erfolgreich in eine Modell-Peptidsequenz eingebaut werden. Trotz niedrigerer Ausbeute im Vergleich zum Referenzpeptid konnten Radikalmarkierungen an verschiedenen Positionen eingeführt werden und die ESR-Aktivität der Radikale nachgewiesen werden. Besonders effizient zeigten sich hier das Monoradikal-Peptid **40** und das Biradikal-Peptid **44**, welche in DNP-Experimenten angewendet werden konnten. Die DNP-NMR-Messungen zeigten ¹H-Signalverstärkungen von 7 für das Monoradikal-Peptid **40** und 41 für das Biradikal-Peptid **44**, sowie ¹³C-Signalverstärkungen für die Kohlenstoffe des Glycerins aus der Matrix von 10 bzw. 40 für die Modellsysteme **40** und **44**. Die hergestellten Biradikal-Spezies sollen später als Modellsysteme für DNP-Studien dienen, um die Distanzabhängigkeit der Signalverstärkung bezüglich der Radikalzentren zu untersuchen.

Durch die erfolgreiche Einführung des Benzophenon funktionalisierten Aminosäurebausteins in eine Tetra-Peptid-Sequenz konnte die Vielseitigkeit der Funktionalisierungsstrategie von Fmoc-Aminosäuren bestätigt werden. Die hergestellte Modellsequenz des Peptides bietet mit Tyrosin (Tyr), Histidin (His) und Glycin (Gly) die aus der Literatur^{164-166, 168} bekannte Möglichkeit für CIDNP-Untersuchungen. Mit Hilfe dieses entwickelten Modellsystems soll in Zukunft die Polarisationsübertragung auf das Rückgrat des Peptides mittels CIDNP beleuchtet werden. Hierfür ist eine enge Zusammenarbeit mit dem *Laboratory of Photochemical Radical Reactions* in Nowosibirsk unter Leitung von Alexandra Yurkovskaya geplant.

Weiterhin konnten zwei neue ortsselektive Markierungen auf Bissulfon-Basis synthetisiert und deren Eignung für die Einführung in die Disulfidbrücke des bioaktiven Moleküls Eptifibatid nachgewiesen werden. Der Amino-TEMPO als auch der Allyl modifizierte Interkalator wurden als Zweikomponentengemisch aus dem Bissulfon **57/59** und dessen Eliminierungsprodukt **58/60** erhalten, wobei jeweils beide Komponenten an der Markierungsreaktion teilnehmen können, da der aktive MICHAEL-Akzeptor **58/60** unter den Reaktionsbedingungen durch Eliminierung entsteht. Als Beispiel für die Durchführbarkeit des Interkalationsverfahrens wurden die Markierungen **58/60** in die Disulfidbrücke von Eptifibatid **54**, einem

synthetischen zyklischen Heptapeptid, welches von einem Desintegrin-Protein aus dem Gift der Klapperschlange *Sistrurus miliarius barbourin* abgeleitet ist, eingebaut.

Die Erhaltung der Aktivität der Radikal-Markierung **57** nach dem Einbau in die Disulfidbindung des Eptifibatids wurde durch ESR-Spektroskopie bestätigt. Angesichts der reduktiven Bedingungen, die für den Einbau der Radikal-Markierung in die Disulfidbrücke notwendig sind (DTT-Reduktion), ist der Erhalt der Aktivität ein wichtiges Ergebnis.²²⁰ Vergleichbare Markierungen (z. B. bis-MTSSL²²²) sind instabil unter diesen Bedingungen. Dies zeigt den entscheidenden Vorteil der hier gezeigten Markierungsstrategie. Schließlich wurden DNP-NMR-Messungen am markierten Eptifibatid erfolgreich durchgeführt. DNP-Signalverstärkungen von 14 für die Protonen und 19 für die Kohlenstoffe des Glycerins aus der Lösungsmittel-Matrix wurden beobachtet, was einer Messzeiterstärkung um einen Faktor 361 für ¹³C entspricht. Für das niedermolekulare Eptifibatid **54**, das hier zur Demonstration der Einführung von Radikal-Markierungen in S-S-Bindungen mit der hier gezeigten Strategie verwendet wurde, konnten nur die hyperpolarisierten ¹³C-Kerne der Lösungsmittelmatrix in den ¹³C-NMR-Spektren beobachtet werden. Diese Beobachtung ist auf die niedrige Konzentration des Peptids zurückzuführen ist bzw. auf ein Signalquenching, welches durch das Radikal verursacht wird. Es wird jedoch angenommen, dass in größeren Modellsystemen, bei Verwendung entsprechender ¹³C-Isotopenmarkierungen auch Signale vom Peptid beobachtet werden können. Somit erscheinen Bindungsstudien wie z. B. des aktivierten Thrombozyten-Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptors möglich.^{208, 221}

Zuletzt wurde der Einbau der Allylmarkierung **59** in die Disulfidbindung des Eptifibatid als Modellsystem realisiert und durch HPLC und ESI-MS nachgewiesen. Erste PHIP-Experimente zeigten den erfolgreichen Transfer von Parawasserstoff in der Hydrierungsreaktion des markierten Eptifibatid **68**. Hierbei konnte ein Verstärkungsfaktor von 445 bestimmt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die erfolgreiche Herstellung und Einführung von Radikal-, Allyl- und Benzophenon-Markierungen in Peptidstrukturen. Diese ebnen den Weg zur Entwicklung und Anwendung leistungsfähiger Verbindungen für die Einführung ortsspezifischer Markierungen in Biomoleküle für Strukturuntersuchungen unter Verwendung von Festkörper-DNP-, PHIP-, CIDNP-NMR oder fortgeschrittenen ESR-Techniken.



10. Experimentalteil

10.1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Anbietern *Sigma-Aldrich*, *Carl Roth GmbH*, *Iris*, *Acros*, *VWR* und *ABCR* bezogen und sofern nicht anders erwähnt, ohne weitere Aufarbeitung eingesetzt.

10.2. Lösungsmittelentfernung

Die Lösungsmittelentfernung erfolgte mit einem *VWR IKA RV10* digital Rotationsverdampfer mit *Leybold Divatron* Steuerungsmodul und einer *Divac 0,6 L* Pumpe bei 40 °C.

10.3. Analytik

10.3.1. RP-HPLC

Die HPLC-Analyse für analytische Trennungen wurde mittels einer *Waters* HPLC Anlage (*Waters Alliance e2695/ Waters 2998 PDA* Detektor) durchgeführt, wobei die Detektionswellenlängen 214 nm, 254 nm und 301 nm betrugen. Das Eluentensystem für die HPLC-Anlage bestand aus Eluent A (0,1 % aq. TFA) und Eluent B (99,9 % Acetonitril mit 0,1 % TFA).

Zur analytischen Trennung bei einer Flussrate von 2 mL/min wurde eine *Multospher 120 RP 18 HP* Säule (Korngröße: 3 µm, Porengröße: 120 Å) von *CS Chromatographie* verwendet. Zur analytischen Trennung bei einer Flussrate von 1 mL/min wurde eine *Nucleosil 100-5 C18* Säule (Korngröße: 5 µm, Porengröße: 100 Å) von *Macerey-Nagel* verwendet. Die verwendeten Trennmethode sind je Synthese angegeben.

Die HPLC-Analyse für präparative Trennungen wurde mittels *Waters* HPLC Anlage (*Waters 600/ Waters 717 plus Autosampler/ Waters 996 PDA* Detektor und *Waters Alliance e2695/ Waters 2998 PDA* Detektor) durchgeführt, wobei die Detektionswellenlängen 214 nm, 254 nm und 301 nm betrugen. Das Eluentensystem für die HPLC-Anlagen bestand aus Eluent A (0,1 % aq. TFA) und Eluent B (99,9 % Acetonitril mit 0,1 % TFA). Die präparative Trennung der hergestellten Rohpeptide erfolgte jeweils mit einer *Knauer Multokrom RP18 20300mm* (Korngröße: 5 µm, Porengröße: 100 Å). Die verwendeten Trennmethode sind je Synthese angegeben.

10.3.2.Ellmans Test

20 mM DTNB-Stammlösung wurde durch Lösen von 8 mg DTNB in 1 mL DMSO erhalten. Eine 100-fache Verdünnung der Stammlösung mit 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat pH 8,0 ergibt 0,2 M DTNB-Arbeitslösung. Die Reduktionsreaktion von DTNB wurde durch aliquote Verteilung von 510 μ l 0,2 mM DTNB-Arbeitslösung in jedes 1-ml-Reaktionsgefäß und durch Zugabe von 50 μ l Proben mit bekannten Konzentrationen in DMSO und Mischen erreicht. Die Blank-Messung wurde durch Zugabe von 50 μ l DMSO zu 510 μ l 0,2 mM DTNB-Arbeitslösung eingestellt. Die Inkubationszeit betrug ca. 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Extinktion wurde mit einem TIDAS S-Spektrometer der J & M Analytik AG gegen die Blank-Probe bei 412 nm gemessen.

10.3.3.MS

Die Massenspektren wurden mit dem ESI-Verfahren an einer Esquire-LC Anlage von *Bruker* an der Serviceabteilung der TU Darmstadt gemessen.

10.3.4.NMR

Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden bei Raumtemperatur mit den Spektrometern ARX 300, DRX 300 (^1H -NMR bei 300 MHz, ^{13}C -NMR bei 75 Mhz) und DRX 500 (^1H -NMR bei 500 MHz, ^{13}C -NMR bei 125 MHz) der Firma *Bruker* durchgeführt. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben. Als interner Standard dient das jeweilige Lösungsmittelsignal. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit Hilfe der Software *MestReNova* von *Mestrelab Research*.

10.3.5.ESR

Die ESR-Spektren wurden für alle Proben mit einem ESR-Miniskop MS 400 (Magnettech, Deutschland) gemessen, das mit einem Temperaturregler A TC H03 und einem TE102-Resonator ausgestattet ist, der bei 9,43 GHz arbeitet. Alle ESR-Spektren wurden mit einer Modulationsamplitude von 0,1 mT und einer Modulationsfrequenz von 100 kHz aufgenommen. Die Spektren wurden unter 24 dB Mikrowellendämpfung mit einer Mantissenverstärkung von 1 und einer exponentiellen Verstärkung von 1 aufgenommen. Die Messungen wurden bei 298 K durchgeführt. Ein Magnetfeldbereich von 14 mT wurde mit einem mittleren B_0 -Feld von 337 mT mit einer Sweep-Zeit von 60 s durchlaufen, um 2048 Punkte zu erfassen.

10.3.6.Festkörper-DNP-NMR

Alle Messungen wurden an einem Bruker Avance NEO 400 MHz DNP-Spektrometer durchgeführt, das mit einem 4.8 T Bruker-Gyrotron-System ausgestattet ist und Mikrowellen (MW) mit einer Frequenz von 263 GHz erzeugt. Eine 3.2 mM Niedertemperatur-Dreifachresonanzsonde wurde in einer $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -Konfiguration verwendet, was zu einer zentralen Frequenz von 400.2 MHz für ^1H und 100,6 MHz für ^{13}C führt. Es wurden nominell Proben Temperaturen von 97 K bzw. 107 K für Messungen ohne bzw. mit MW-Bestrahlung notiert. Der Unterschied in der Temperatur wird durch die MW-Bestrahlung bei einer festen maximalen Kühlleistung verursacht. Für alle ^1H - und $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR-Spektren wurde eine MAS-Spinnfrequenz von 8 kHz verwendet.

^1H -MAS-Messungen wurden mit einem $\pi/2$ -Anregungspuls von $2.3 \mu\text{s}$ und einer Recycle-Verzögerung von 5 s durchgeführt. 4 Scans wurden angewendet. Die Spektren wurden auf TMS referenziert, indem das Signal des Siliziumstopfens auf 0 ppm gesetzt wurde.

$^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -CP-MAS-Experimente wurden mit einer Kontaktzeit von 2 ms aufgenommen. Die Recycle-Verzögerung wurde auf 18,2 s eingestellt und es wurden 8 Scans aufgenommen. Die Recycle-Verzögerung wurde auf das 1,3-fache von T_1 der Protonen eingestellt, das mit einem T_1 -Aufbau-Experiment unter Verwendung einer Sättigungserholungs-Pulssequenz gemessen wurde. Die ^{13}C -Spektren wurden relativ zum Signal des Siliziumstopfens referenziert ($-\text{Si-CH}_3$ 0 ppm). Zur Entkopplung der Protonen wurde die Spinal-64-Pulssequenz verwendet.²²³

10.3.7.PHIP-NMR

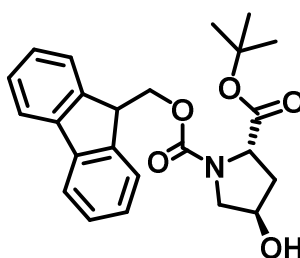
Die Hydrierungsreaktion wurde bei Raumtemperatur in 5 mM Schraubdeckel-NMR-Röhrchen durchgeführt, die mit einem Silikongummiseptum ausgestattet waren. Hierbei wurde 0,1 mg Eptifibatid und 1,7 mg eines Rhodiumkatalysators ([1,4-Bis(diphenylphosphino)butan](1,5-cyclooctadien)rhodium(I)tetrafluoroborat; Rh-Cat) in 500 μ L Methanol- d_4 gelöst. Das NMR-Röhrchen wurde verschlossen und Parawasserstoff-angereichertes Wasserstoffgas durch das Septum mit einem Druck von 5 bar in das Probenröhrchen für 10 s geblubbert. Die Probe wurde dann in das Spektrometer eingesetzt und eine Standard-PHIP-Sequenz (d.h. Signalerfassung nach einem 45° -Puls) zur Bestrahlung angewendet. Alle PHIP-Spektren wurden als "Single-Shot-Experimente" aufgenommen, d.h. ein Scan wurde aufgenommen. Zum Vergleich wurde ein Hintergrundspektrum vor der Hydrierung und ein thermisches (entspanntes Spektrum) nach der Hydrierung aufgenommen. Die Anzahl der Scans wurde individuell, entsprechend dem Signal-Rausch-Verhältnis, angepasst.

11. Synthesen

11.1. Synthese von C-Terminal *tert*-Butyl-geschützten Fmoc-Aminosäuren

Die Arbeitsvorschriften sind inspiriert von Experimenten nach KNERR *et al.* ²²⁴ und HEUCKENDORFF *et al.* ²²⁵ und wurden von BRODRICHT *et al.* publiziert. ²⁰²

11.1.1. Synthese von Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-O^tBu **15**

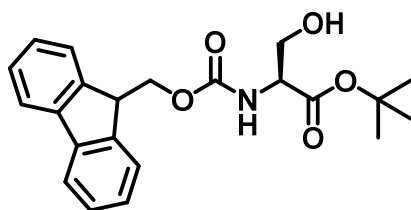


15

Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-OH **12** (1 Äq., 8,0 mMol, 2,88 g) wurde in 40 mL THF gelöst und unter Kühlung (Eisbad: 0-5 °C) mit *tert*-Butyl 2,2,2-trichloroacetamid **9** (1,33 Äq., 10,7 mMol, 1, mL) versetzt. Die Kühlung wurde entfernt und die Reaktionslösung bei 60 °C gerührt. Die Reaktion wurde via HPLC überwacht und zwei weitere Zugaben von **9** getätigt: Nach einer Stunde (1,33 Äq., 10,7 mMol, 1,98 mL) und nach zwei Stunden (1,33 Äq., 10,7 mMol, 1,98 mL). Die Reaktion wurde für weitere vier Tage gerührt. Eine letzte Zugabe von **9** (0,5 Äq., 7 mMol, 0,93 mL) und zwei Stunden Reaktionszeit führte zu einer vollständigen Umsetzung des Eduktes **12**. THF wurde unter vermindertem Druck entfernt und der erhaltene Feststoff in DCM gelöst. Der unlösliche Feststoff wurde abfiltriert und das DCM-Filtrat mit gesättigter NaHCO₃(aq)-Lösung, 0,1 M NaOH(aq), demineralisiertem Wasser und gesättigter NaCl(aq) Lösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C unter vermindertem Druck entfernt, wobei 3,67 g rohes **15** als farbloser Feststoff erhalten wurde. Das Produkt wurde für die nächsten Reaktionsschritte ohne Aufreinigung verwendet.

HPLC: $t_R = 6,26$ min; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 410,2$ m/z (berechnet 410,2 m/z); **¹H-NMR** (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 7,89, 7,65, 7,42, 7,34, 4,29, 4,26, 4,14, 3,39, 1,90, 1,38; **¹³C-NMR** (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 162,81, 153,88, 143,72, 140,68, 127,63, 127,05, 125,04, 120,09, 80,47, 67,63, 66,59, 58,49, 54,97, 46,51, 37,85, 27,26.

11.1.2.Synthese von Fmoc-NH-L-Ser(OH)-O^tBu **16**

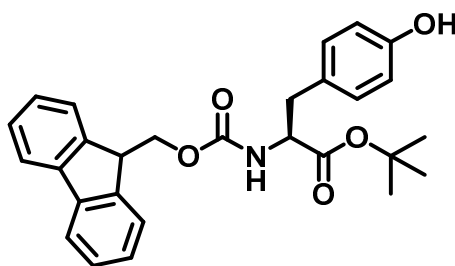


16

Fmoc-NH-L-Ser(OH)-OH **13** (1 Äq., 8,0 mMol, 2,67 g) wurde in 40 mL DCM:Ethylacetat 1:1 (v/v) gelöst und unter Kühlung (Eisbad: 0-5 °C) langsam mit *tert*-Butyl 2,2,2-trichloroacetamid **9** (1,33 Äq., 10,7 mMol, 1,98 mL) versetzt. Die Kühlung wurde entfernt und die Reaktionslösung bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wurde via HPLC überwacht und zwei weitere Zugaben von **9** getätigt: Nach einer Stunde (1,33 Äq., 10,7 mMol, 1,98 mL) und nach zwei Stunden (1,33 Äq., 10,7 mMol, 1,98 mL). Die Reaktion wurde für weitere vier Tage gerührt. Eine letzte Zugabe von **9** (0,5 Äq., 7 mMol, 0,93 mL) und zwei Stunden Reaktionszeit führte zu einer vollständigen Umsetzung des Eduktes **13**. Das Ethylacetat/DCM-Gemisch wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Feststoff wieder in DCM gelöst. Der unlösliche Feststoff wurde abfiltriert und das DCM-Filtrat mit gesättigter NaHCO₃(aq)-Lösung, 0,1 M NaOH(aq), demineralisiertem Wasser und gesättigter NaCl(aq)-Lösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C unter vermindertem Druck entfernt, wobei 4,32 g rohes **16** als farbloser Feststoff erhalten wurde. Das Produkt wurde für die nächsten Reaktionsschritte ohne Aufreinigung verwendet.

HPLC: $t_R = 6,17$ min; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 384,19$ m/z (berechnet 384,18 m/z); **¹H-NMR** (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 7,88, 7,73, 7,42, 7,33, 6,92, 4,29, 4,22, 4,01, 3,50, 1,39; **¹³C-NMR** (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 162,81, 155,98, 143,76, 140,67, 127,58, 127,00, 25,20, 120,04, 80,53, 65,65, 61,34, 57,24, 46,60, 27,66.

11.1.3.Synthese von Fmoc-NH-L-Tyr(OH)-O^tBu **17**



17

Fmoc-NH-L-Tyr(OH)-OH **14** (1 Äq., 2,0 mMol, 0,79 g) wurde in 20 mL Ethylacetat gelöst und bei Raumtemperatur in den nächsten drei Stunden jede Stunde jeweils mit **9** (1,33 Äq., 2,7 mMol, 0,49 mL) versetzt. Die Reaktionslösung wurde bei Raumtemperatur für drei Tage gerührt und via HPLC überwacht. Anschließend wurde eine weitere Zugabe von **9** (0,5 Äq., 1,0 mMol, 0,2 mL) getätigt. Nach 24 Stunden wurde die Reaktionslösung auf 40°C erhitzt und zwei weitere Zugaben von **9** (0,5 Äq., 1,0 mMol, 0,2 mL) getätigt. Die Reaktionslösung wurde für zwei Stunden gerührt, um eine vollständige Umsetzung des Eduktes **5** zu erreichen. Das Ethyl Acetat wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Feststoff wieder in DCM gelöst. Der unlösliche Feststoff wurde abfiltriert und das DCM-Filtrat mit gesättigter NaHCO₃(aq)-Lösung, 0,1 M NaOH(aq), demineralisiertem Wasser und gesättigter NaCl(aq)-Lösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde bei 40°C unter vermindertem Druck entfernt, wobei 1,16 g rohes **17** als farbloser Feststoff erhalten wurde. Das Produkt wurde für die nächsten Reaktionsschritte ohne Aufreinigung verwendet.

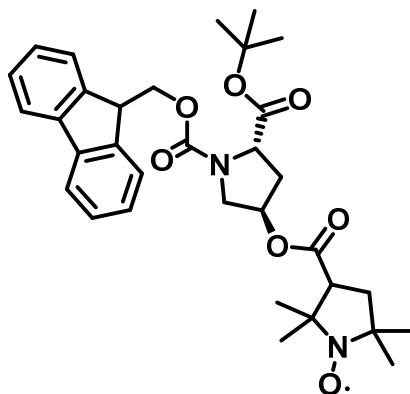
HPLC: t_R = 8,07 min; **ESI-MS:** $[M+H]^+$ = 460,21 m/z (berechnet 460,2 m/z), $[(M)2+H]^+$ = 919,42 m/z (berechnet 919,42 m/z); **¹H-NMR** (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 8,99, 7,87, 7,67, 7,41, 7,34, 7,03, 6,68, 4,23, 4,18, 4,05, 2,80, 1,53; **¹³C-NMR** (DMSO-d₆, 500 MHz): δ [ppm] = 171,07, 155,78, 143,70, 140,64, 129,99, 127,20, 121,29, 119,93, 114,89, 65,56, 56,35, 46,58, 35,95, 26,89.

11.2. Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-1) PROXYL-Funktionalisierung von C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure an ihrer reaktiven Alkoholseitenkette

Die Synthesen wurden analog zu den Experimenten IKEDA *et al.*¹⁹⁸ durchgeführt und von BRODRECHT *et al.* publiziert.²⁰²

Die C-terminal geschützte Fmoc-Aminosäure wird in 20 mL Dichlormethan pro Gramm der Aminosäure gelöst und mit 1,1 Äq. *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid **19** (EDC·HCl) versetzt. Anschließend werden 0,11 Äq. 4-(Dimethylamino)-pyridin **20** (DMAP) und 1,1 Äq. 3-Carboxy-PROXYL **8** hinzugegeben. Die Reaktion wird für 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, anschließend mit 0,5 M Salzsäure-, gesättigter Natriumhydrogencarbonat- und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Schließlich wird das Lösungsmittel bei 40 °C unter vermindertem Druck entfernt.

11.2.1. Synthese von Fmoc-*NH*-L-Hyp(*O*-PROXYL)-*O*^tBu **21**

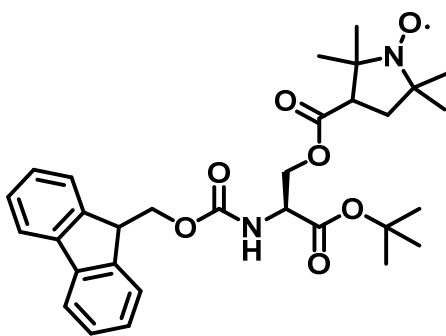


21

Die Synthese wurde nach AAV-1 durchgeführt. Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-OtBu **15** (1 Äq., 2,4 mMol, 1,135 g), EDC·HCl **19** (1,1 Äq., 2,64 mMol, 0,51 g), DMAP **20** (0,11 Äq., 0,26 mMol, 33 mg) und 3-Carboxy-PROXYL **8** (1,1 Äq., 2,64 mMol, 502 mg) ergaben 1,26 g rohes **21** als gelben Feststoff.

HPLC: $t_R = 9,40$ min; **ESI-MS:** $[M]^+ = 577,3$ m/z (berechnet 577,3 m/z), $[M+Na]^+ = 600,3$ m/z (berechnet 600,3 m/z).

11.2.2.Synthese von Fmoc-NH-L-Ser(O-PROXYL)-O^tBu 22

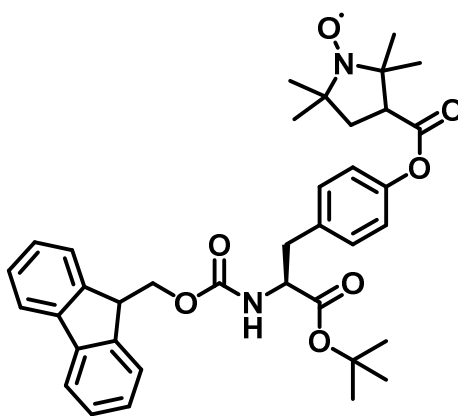


22

Die Synthese wurde nach AAV-1 durchgeführt. Fmoc-NH-L-Ser(OH)-OtBu **16** (1 Äq., 0,5 mMol, 215 mg), EDC·HCl **19** (1,1 Äq., 0,55 mMol, 105 mg), DMAP **20** (0,11 Äq., 0,06 mMol, 7 mg) und 3-Carboxy-PROXYL **8** (1,1 Äq., 0,55 mMol, 105 mg) ergaben 180 mg rohes **22** als gelben Feststoff.

HPLC: t_R = 9,04 min; **ESI-MS:** $[M]^+$ = 551,3 m/z (berechnet 551,3 m/z), $[M+H]^+$ = 552,3 m/z (berechnet 552,3 m/z), $[M+2H]^+$ = 553,3 m/z (berechnet 553,3 m/z).

11.2.3.Synthese von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PROXYL)-O^tBu 23



23

Die Synthese wurde nach AAV-1 durchgeführt. Fmoc-NH-Tyr(OH)-OtBu **17** (1 Äq., 0,5 mMol, 278 mg), EDC·HCl **19** (1,1 Äq., 0,55 mMol, 105 mg), DMAP **20** (0,11 Äq., 0,06 mMol, 7 mg) und 3-Carboxy-PROXYL **8** (1,1 Äq., 0,55 mMol, 105 mg) ergaben 180 mg rohes Fmoc-NH-L-SER(PROXYL)-O^tBu **23** als gelben Feststoff.

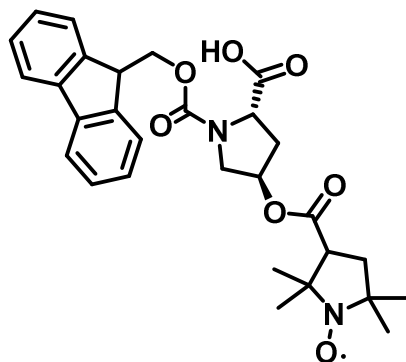
HPLC: t_R = 7,82 min; **ESI-MS:** $[M]^+$ = 627,3 m/z (berechnet 627,3 m/z), $[M+H]^+$ = 628,3 m/z (berechnet 628,3 m/z), $[M+2H]^+$ = 629,3 m/z (berechnet 629,3 m/z).

11.3. Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-2) zur Entfernung der C-Terminalen *tert*-Butyl-Schätzung einer PROXYL-funktionalisierten Aminosäure

Die Synthesen wurden analog zu den Experimenten von KOIVISTO *et al.* ¹⁹⁹ durchgeführt und von BRODRICHT *et al.* publiziert. ²⁰²

Der *tert*-Butylcarboxylester wird in 10 mL Dichlormethan pro Gramm des Esters gelöst, auf 0°C gekühlt und langsam mit 89 Äq. gekühlter 95 %iger Trifluoressigsäure versetzt. Die Reaktionslösung wird für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Lösungsmittel bei 40 °C unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wird in DCM gelöst und jeweils drei Mal mit destilliertem Wasser und gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen (DCM:Waschlösung 3:1 (v/v)) und über Natriumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel bei 40 °C unter reduziertem Druck entfernt. Der erhaltene Feststoff wird mittels Säulenchromatographie aufgereinigt und das Lösungsmittel entfernt.

11.3.1.Synthese von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-OH **23**

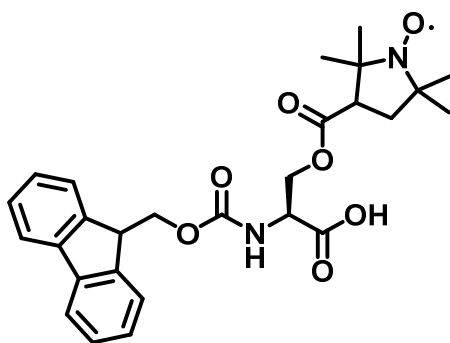


23

Die Synthese wurde nach AAV-2 durchgeführt, wobei Fmoc-NH-L-Hyp(PROXYL)-O^tBu **21** (1 Äq., 2,2 mMol, 1,26 g) als *tert*-Butylcarboxylester mit TFA (89,0 Äq., 194,0 mMol, 15,63 mL) versetzt wurde. Dabei wurde die anfangs gelbe Lösung schwarz. Die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde mit einem Hexan/Essigethylester/Essigsäure-Gemisch im Verhältnis 9,5/9,5/1 (v/v/v) durchgeführt, um 535 mg (43 % über alle drei Reaktionsschritte) **23** mit einer Reinheit von >99 % als gelben Feststoff zu erhalten.

HPLC: $t_R = 5,47$ min; **ESI-MS:** $[M]^+ = 521,2$ m/z (berechnet 521,2 m/z), $[M+H]^+ = 522,2$ m/z (berechnet 522,2 m/z), $[M+2H]^+ = 523,2$ m/z (berechnet 523,2 m/z).

11.3.2.Synthese von Fmoc-NH-L-Ser(O-PRX)-OH 25

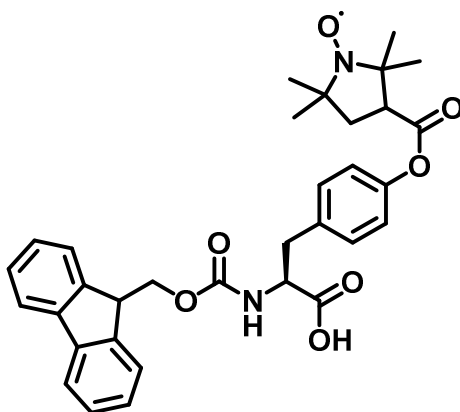


25

Die Synthese wurde nach AAV-2 durchgeführt, wobei Fmoc-NH-L-Ser(PROXYL)-O^tBu **22** (1 Äq., 0,3 mMol, 0,18 g) als *tert*-Butylcarboxylester mit TFA (89,0 Äq., 28,9 mMol, 2,33 mL) versetzt wurde. Dabei wurde die anfangs gelbe Lösung schwarz. Die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde mit einem Hexan/Essigethylester-Gemisch im Verhältnis 1/1 durchgeführt, um 0,039 g (24 %, 16 % über alle drei Reaktionsschritte) **25** mit einer Reinheit von >99 % als gelben Feststoff zu erhalten.

HPLC: $t_R = 5,44$ min; **ESI-MS:** $[M]^+ = 496,21$ m/z (berechnet 496,21 m/z), $[M+H]^+ = 497,21$ m/z (berechnet 497,21 m/z), $[M+2H]^+ = 498,21$ m/z (berechnet 498,21 m/z), $[M+Na]^+ = 518,20$ m/z (berechnet 518,20 m/z), $[M+NH_4]^+ = 513,20$ m/z (berechnet 513,20 m/z).

11.3.3.Synthese von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PRX)-OH 26



26

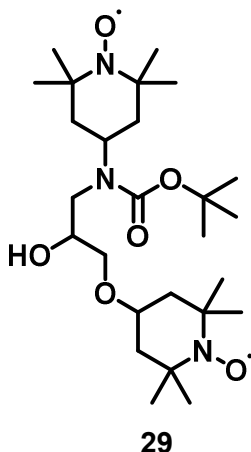
Die Synthese wurde nach AAV-2 durchgeführt, wobei Fmoc-NH-L-Tyr(PROXYL)-O^tBu **23** (1 Äq., 0,4 mMol, 0,23 g) als *tert*-Butylcarboxylester mit TFA (89,0 Äq., 32,9 mMol, 2,65 mL) versetzt wurde. Dabei wurde die anfangs gelbe Lösung schwarz. Die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie wurde mit einem Hexan/Essigethylester/Essigsäure-Gemisch im

Verhältnis 9,5/9,5/1 (v/v/v) durchgeführt, um 0,12 g (58 %, 43 % über alle drei Reaktionsschritte) **26** mit einer Reinheit von >99 % als gelben Feststoff zu erhalten.

HPLC: $t_R = 6,30$ min; **ESI-MS:** $[M]^+ = 571,2$ m/z (berechnet 571,2 m/z), $[M+H]^+ = 572,2$ m/z (berechnet 572,2 m/z), $[M+2H]^+ = 573,2$ m/z (berechnet 573,2 m/z).

11.4. Synthese einer TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure

11.4.1. Synthese von HO-TOTAPOL-*N*-Boc **29**

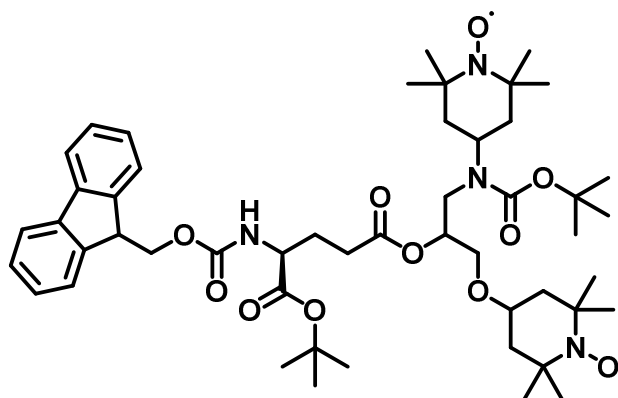


Die Synthese wurde analog zur Literatur durchgeführt.²⁰³

TOTAPOL **27** (1-[(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxidopiperidin-4-yl)amino]-3-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxopiperidin-1-ium-4-yl)oxypropan-2-ol) (1 Äq., 4,48 mMol, 1,79 g) wurde in 87 mL DCM gelöst, mit DIPEA **6** (1,2 Äq., 4,705 mMol, 0,92 mL) versetzt und Bis(2-methyl-2-propanyl)dicarbonat **30** (Boc-Anhydrid) (1,05 Äq., 4,71 mMol, 1,04 g) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 1h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde je drei Mal mit dest. Wasser und mit Brine gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurden 2,2 g eines rötlichen Feststoffs **29** erhalten.

HPLC: $t_R = 4,7$ min; **ESI-MS:** $[M]^+ = 499,4$ m/z (berechnet 499,4 m/z), $[M+H]^+ = 500,4$ m/z (berechnet 500,4 m/z).

11.4.2.Synthese von Fmoc-NH-L-Glu(O-Totapol-N-Boc)-O^tBu 32

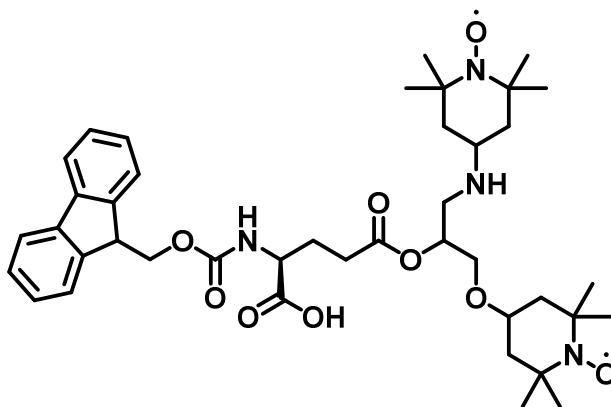


32

Die Synthese wurde nach AAV-1 durchgeführt. **29** (1 Äq., 0,2 mMol, 100 mg), EDC·HCl **19** (1,1 Äq., 0,22 mMol, 43 mg), DMAP **20** (0,11 Äq., 0,02 mMol, 3 mg) und Fmoc-NH-L-Glu-O^tBu **31** (1,1 Äq., 0,22 mMol, 96 mg) ergaben 200 mg rohes **32** als roten Feststoff, welches ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt verwendet wurde.

HPLC: $t_R = 6,1$ min; **ESI-MS:** $[M]^+ = 906,5$ m/z (berechnet 906,5 m/z), $[M+H]^+ = 907,5$ m/z (berechnet 907,5 m/z).

11.4.3.Synthese von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL)-OH 72

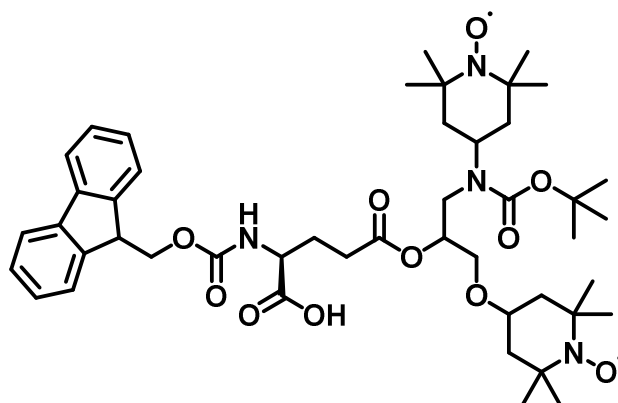


72

Die Synthese wurde nach AAV-2 durchgeführt, wobei das Rohprodukt Fmoc-NH-L-Glu(O-Totapol-N-Boc)-O^tBu **32** (1 Äq., 0,2 mMol, 200 mg) als *tert*-Butylcarboxylester mit TFA (89,0 Äq., 32,9 mMol, 2,65 mL) versetzt wurde. Dabei wurde die anfangs rote Lösung schwarz. Anschließend wurde je drei Mal mit dest. Wasser und Brine gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es wurden 150 mg eines rötlichen Feststoffs **72** erhalten, welches ohne weitere Aufreinigung im nächsten Reaktionsschritt verwendet wurde.

ESI-MS: $[M+H]^+ = 751,4$ m/z (berechnet 751,4 m/z), $[M+2H]^+ = 752,4$ m/z (berechnet 572,4 m/z).

11.4.4.Synthese von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL-N-Boc)-OH **33**



33

Die Synthese wurde analog zur Literatur durchgeführt.²⁰³

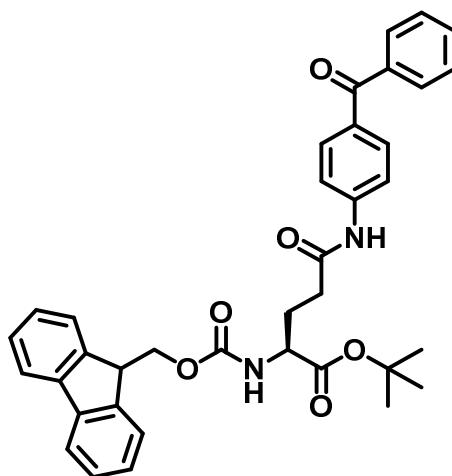
Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL)-OH **72** (1 Äq., 0,2 mMol, 150 mg) wurde in 4 mL DCM gelöst, mit DIPEA (1,2 Äq., 0,24 mMol, 0,04 mL) versetzt und Boc-Anhydrid **30** (1,05 Äq., 0,21 mMol, 46 mg) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 1h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde je drei Mal mit dest. Wasser und mit Brine gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt. Es konnten 170 mg Rohprodukt **33** isoliert und anschließend mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 9 mL/min und einen Gradienten von 40 % auf 95 % Eluent A in 60 Minuten.

Das erhaltene Peptid **33** konnte mit 50 mg als roter Feststoff isoliert werden.

HPLC: $t_R = 7,2 \text{ min}$; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 851,5 \text{ m/z}$ (berechnet 851,5 m/z), $[M+2H]^+ = 852,5 \text{ m/z}$ (berechnet 852,5 m/z).

11.5. Synthese einer Benzophenon-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure

11.5.1. Synthese von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-O^tBu 35

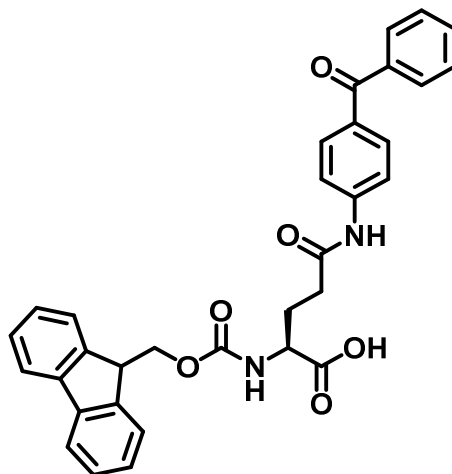


35

Die Synthese wurde nach AAV-1 durchgeführt. 3-Amino-Benzophenon **34** (1,1 Äq., 5,0 mMol, 1,01 g), EDC·HCl **19** (1,1 Äq., 5,5 mMol, 1,07 g), DMAP **20** (0,11 Äq., 0,55 mMol, 68 mg) und Fmoc-NH-L-Glu(OH)-OtBu **31** (1 Äq., 5,5 mMol, 2,39 g) ergaben 3,4 g rohes **35** als gelben Feststoff.

HPLC: $t_R = 7,4$ min; ESI-MS: $[M+H]^+ = 605,3$ m/z (berechnet 605,3 m/z)

11.5.2. Synthese von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH 36



36

Die Synthese wurde nach AAV-2 durchgeführt.

Dabei wurde Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-O^tBu **35** (1 Äq., 5,0 mMol, 3,4 g) als *tert*-Butylcarboxylester mit TFA (89,0 Äq., 445 mMol, 35,9 mL) versetzt. Währenddessen wurde die anfangs gelbe Lösung grün. Die Aufreinigung mittels Säulenchromatographie

wurde mit einem Hexan/Essigethylester-Gemisch im Verhältnis 2/1 (v/v) durchgeführt, um 1,35 g **36** als gelben Feststoff zu erhalten.

HPLC: $t_R = 5,5$ min; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 549,2$ m/z (berechnet 549,2 m/z), $[2M+H]^+ = 1097,4$ m/z (berechnet 1097,4 m/z); **1H -NMR** (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ [ppm] = 12,70, 10,32, 7,85, 7,75, 7,72, 7,71, 7,68, 7,62, 7,52, 7,39, 7,31, 4,27, 4,20, 4,05, 2,50, 2,12, 1,91; **^{13}C -NMR** (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ [ppm] = 194,50, 173,62, 171,04, 156,17, 143,80, 143,40, 140,70, 137,59, 132,15, 131,12, 129,31, 128,43, 127,62, 127,06, 125,27, 120,09, 118,25, 65,69, 53,36, 46,65, 39,52, 32,94, 26,31.

11.6. Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV-3) zur manuellen SPPS

Die Synthesen der Peptide wurden nach AMBLARD *et al.* durchgeführt.¹⁹¹

Lösungsmittelbezeichnungen: Die beiden Bezeichnungen DMF I und DMF II beziehen sich auf das gleiche Lösungsmittel – Dimethylformamid – in unterschiedlichen Gefäßen und dienen der Waschschrte in der Synthese. Hierbei wird DMF II für die Waschschrte der Kopplung verwendet. Während DMF I bei Fmoc-Entschützungen verwendet wird. Dadurch kann eine Kontamination mit Piperidin für DMF II verringert werden, um das Risiko einer negativen Beeinflussung der Kopplungsschrte zu minimieren.

Die Harz-Voraktivierung des Chlortrityl-Harzes wird in einer 10 mL-Synthesespritze mit Frittenboden realisiert. Erst wird das Harz für 60 Minuten in DMF II gequollen und anschließend das Harz mit einer Diisopropylethylamin (DIPEA) **6**/Dimethylformamid-Lösung im Verhältnis 1 mL/7 mL pro Gramm Harz für 60 Minuten voraktiviert.

Die Kopplung wird jeweils doppelt und im Überschuss ausgeführt, um eine maximal hohe Beladung zu erreichen. Jede Fmoc-Aminosäure wird in 12 mL DMF II je Gramm Fmoc-Aminosäure gelöst. An das aktivierte Harz wird die erste Fmoc-Aminosäure mit DIPEA **6** (2,0 Äq. bezogen auf 1,0 Äq. Aminosäure) gekoppelt. Ab der zweiten Kopplung wird zusätzlich HATU **5** (0,985 Äq. bezogen auf 1,0 Äq. Aminosäure) hinzugegeben. Nach dem Aufziehen der Reaktionslösung auf die Spritze mit dem Harz wird die Reaktionslösung 30 Minuten geschüttelt. Anschließend wird die Lösung entfernt und das Harz 4-mal mit DMF II für je 1 Minute gewaschen. Diese Kopplung wird mit dem gleichen Ansatz erneut wiederholt. Anschließend wird das Harz 4-mal mit DMF II für je 1 Minute gewaschen. Zum Ende jeder Kopplung wird die Fmoc-Schutzgruppe der gekoppelten Aminosäure abgespalten.

Die Fmoc-Abspaltung dient zur Entfernung der N-terminalen Schutzgruppe, wobei das Harz zuerst für 5 und anschließend für 15 Minuten mit einer 20%igen Piperidin/Dimethylformamid-Lösung versetzt wird. Daraufhin wird 3-mal mit DMF I und danach 3-mal mit

DMF II für je 1 Minute gewaschen. Nach diesem Schritt kann eine neue Kopplung durchgeführt werden.

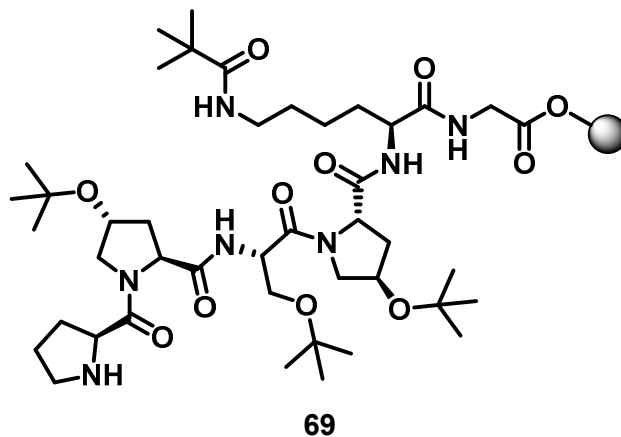
Als **letzte Kopplung** wird Acetyl-Glycin-OH (mit DIPEA 6 und HATU 5), 3-Carboxy-PROXYL 8 (mit DIPEA 6 und HATU 5) oder Essigsäureanhydrid (mit DIPEA 6 und ohne HATU 5) verwendet, wodurch abschließend der N-Terminus pH-unabhängig geschützt bleibt. Zum Schluss wird das Harz 6-mal mit Dichlormethan gewaschen und über Nacht unter Hochvakuum getrocknet

Die Abspaltung des Peptids vom Harz: Je 100 mg Harz werden 1 mL Abspalllösung (95/2,5/2,5 = 95%ige Trifluoressigsäure/Anisol/Triisopropylsilan v/v/v) verwendet und die Reaktionslösung 3 Stunden geschüttelt. Das Peptid wird in kaltem *tert*-Butylmethylether gefällt, für 30 Minuten bei -20 °C inkubiert und anschließend 1-mal mit kaltem *tert*-Butylmethylether und 1-mal mit kaltem Dieethylether gewaschen.

Die Aufreinigung der Peptide erfolgte durch präparative Trennungen mittels HPLC-Analysen. Anschließend wurde das Lösungsmittel mittels Gefriertrocknung entfernt.

11.7. Synthese Radikal-funktionalisierter Peptide und ihres Referenzpeptides

11.7.1. Synthese von HN-Pro-Hyp(tBu)-Ser(tBu)-Hyp(tBu)-Lys(Boc)-Gly-CTC-Resin 69



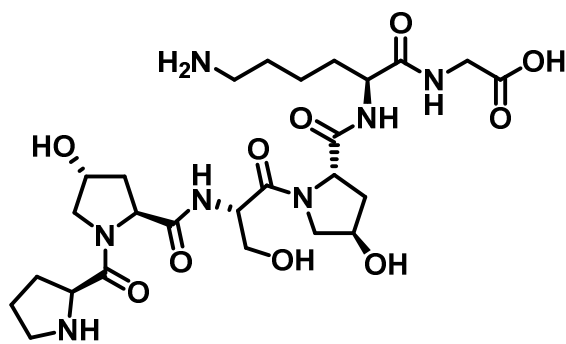
Die Synthese wurde nach AAV-3 ohne Harz-Abspaltung durchgeführt, wobei die Einwaagen der einzelnen Kopplungen aus Tabelle 11-1 entnommen werden können. In der angegebenen Reihenfolge wurden die Aminosäuren an das Chlorotrityl-Harz (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,55 g) gekoppelt.

Das erhaltene Rohprodukt **69** wurde für eine Testabspaltung nach AAV-3 und vier unterschiedliche ergänzende Kopplungen in insgesamt fünf Teile aufgeteilt.

Tabelle 11-1: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **69**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Einwaage [g]
1	Fmoc-Gly-OH	2	1,606	0,478
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2	1,606	0,753
3	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	1,606	0,568
4	Fmoc-NH-L-Ser(tBu)-OH	2	1,606	0,616
5	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	1,606	0,568
6	Fmoc-Pro-OH·H ₂ O	2	1,606	0,568

11.7.2.Synthese von HN-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly **71**



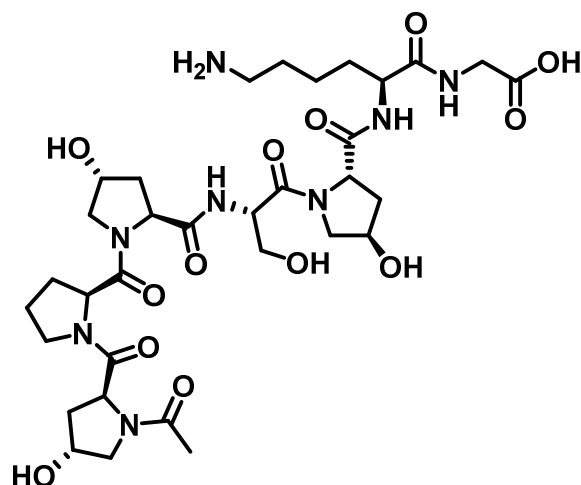
71

Die Testabspaltung von **69** resultierte in 99 mg Rohprodukt des Peptids **71** und wurde mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 8 mL/min und einen Gradienten von 5 % auf 33 % Eluent A in 50 Minuten.

Das erhaltene Peptid **71** konnte mit 50 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von >99 % isoliert werden.

HPLC: $t_R = 7,27$ min; **ESI-MS:** $[M+1H]^+ = 614,3$ m/z (berechnet 614,3 m/z); $[M+2H]^{2+} = 307,7$ m/z (berechnet 307,7 m/z)

11.7.3.Synthese von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 37



37

Es wurden 0,2 g **69** (1 Äq., 1,46 mmol/g, 0,11 g CTC-Harz) verwendet, um ergänzende Kopplungen nach AAV-3 durchzuführen. Hierbei wurden die Einwaagen aus Tabelle 11-2 verwendet.

Es konnten 99 mg Rohprodukt **37** isoliert werden. Anschließend wurde mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 8 mL/min und einen Gradienten von 5 % auf 33 % Eluent A in 50 Minuten.

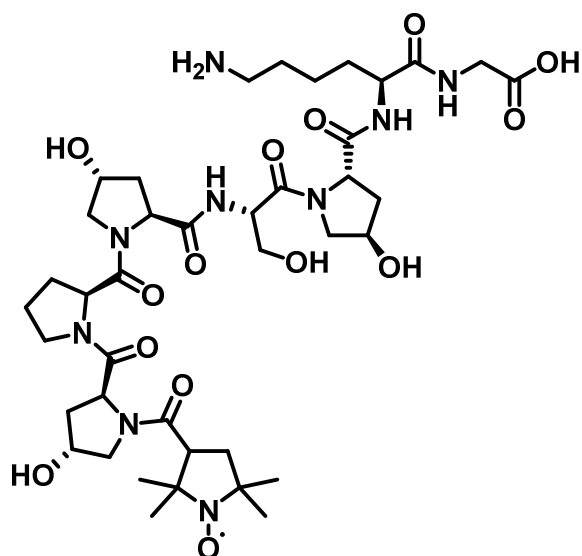
Das erhaltene Peptid **37** konnte mit 40 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 99 % isoliert werden.

HPLC: $t_R = 9,0 \text{ min}$; **ESI-MS:** $[M+1H]^+ = 614,3 \text{ m/z}$ (berechnet 614,3 m/z); $[M+2H]^{2+} = 307,7 \text{ m/z}$ (berechnet 307,7 m/z)

Tabelle 11-2: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **37**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Einwaage [g]
7	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,321	0,114
8	Essigsäureanhydrid	2	0,321	0,121

11.7.4.Synthese von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 38



38

Es wurden 0,2 g **69** (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,11 g CTC-Harz) verwendet, um ergänzende Kopplungen nach AAV-3 durchzuführen. Hierbei wurden die Einwaagen aus Tabelle 11-3 verwendet.

Es konnten 133 mg Rohprodukt **38** isoliert werden. Anschließend wurde mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 8 mL/min und einen Gradienten von 5 % auf 33 % Eluent A in 50 Minuten.

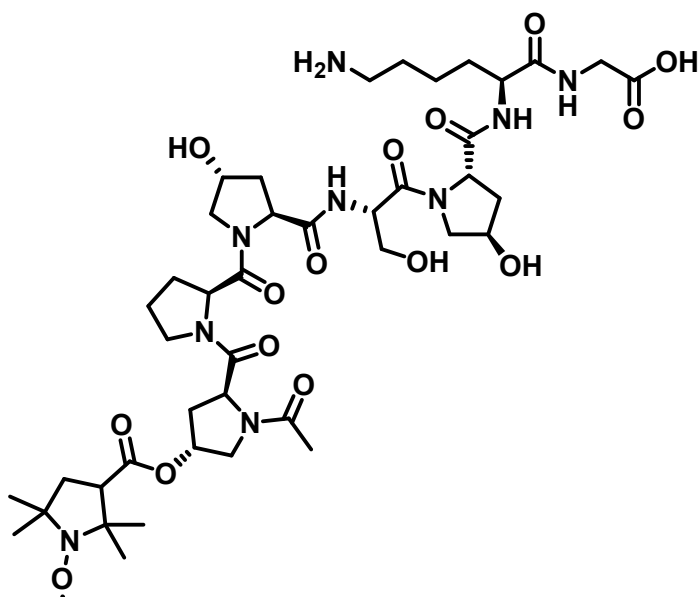
Das erhaltene Peptid **38** konnte mit 34 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 98 % isoliert werden.

HPLC: $t_R = 13,7 \text{ min}$; **ESI-MS:** $[M+1H]^+ = 895,5 \text{ m/z}$ (berechnet 895,5 m/z); $[M+2H]^+ = 896,5 \text{ m/z}$ (berechnet 896,5 m/z)

Tabelle 11-3: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **38**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Einwaage [g]
7	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,321	0,114
8	3-Carboxy-PROXYL 8	2	0,321	0,06

11.7.5.Synthese von Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 39



39

Es wurden 0,2 g **69** (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,11 g CTC-Harz) verwendet, um ergänzende Kopplungen nach AAV-3 durchzuführen. Hierbei wurden die Einwaagen aus Tabelle 11-4 verwendet.

Es konnten 133 mg Rohprodukt **39** isoliert und anschließend mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 8 mL/min und einen Gradienten von 5 % auf 33 % Eluent A in 50 Minuten.

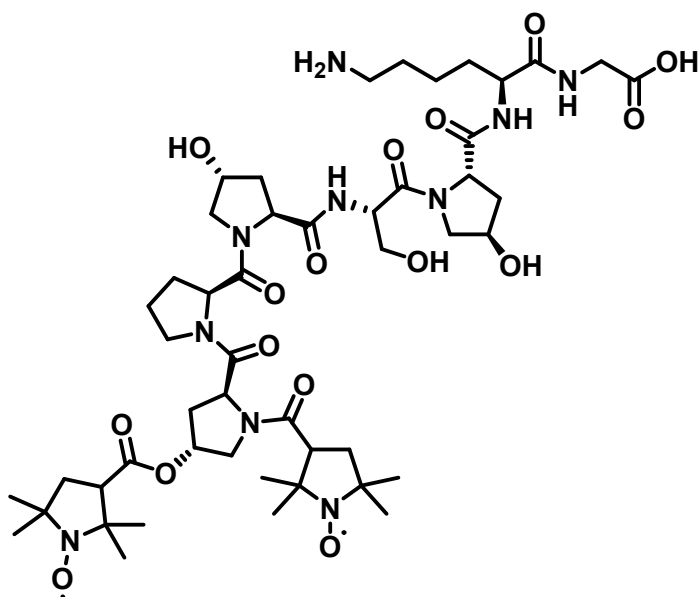
Das erhaltene Peptid **39** konnte mit 40 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 98% isoliert werden.

HPLC: $t_R = 17,9 \text{ min}$; **ESI-MS:** $[M+1H]^+ = 937,5 \text{ m/z}$ (berechnet 937,5 m/z);
 $[M+2H]^+ = 938,5 \text{ m/z}$ (berechnet 938,5 m/z); $[M+3H]^{2+} = 469,7 \text{ m/z}$
(berechnet 469,7 m/z)

Tabelle 11-4: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **39**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge	Einwaage
			[mmol]	[g]
7	Fmoc-NH-L-Hyp(PROXYL)-OH 23	1,25	0,2	0,105
8	Essigsäureanhydrid	2	0,321	0,033

11.7.6.Synthese von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42



42

Es wurden 0,2 g **69** (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,11 g CTC-Harz) verwendet, um ergänzende Kopplungen nach AAV-3 durchzuführen. Hierbei wurden die Einwaagen aus Tabelle 11-5 verwendet.

Es konnten 155 mg Rohprodukt **42** isoliert werden. Anschließend wurde mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 8 mL/min und einen Gradienten von 5 % auf 33 % Eluent A in 50 Minuten.

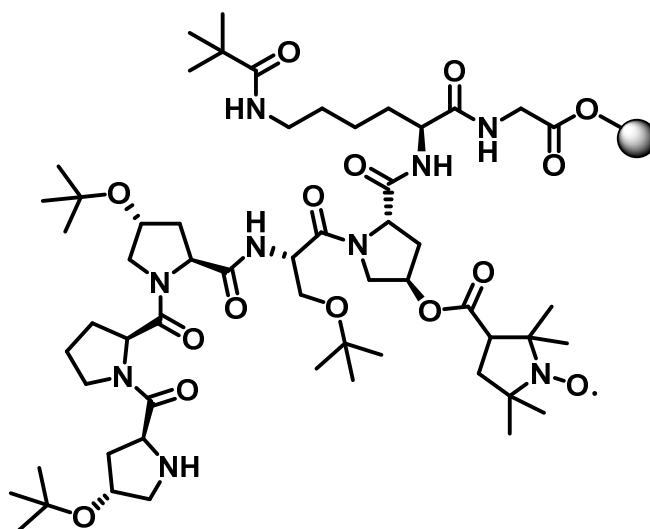
Das erhaltene Peptid **42** konnte mit 11 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 93% isoliert werden.

HPLC: $t_R = 22,8 \text{ min}$; **ESI-MS:** $[M+2H]^+ = 1064,6 \text{ m/z}$ (berechnet 1064,6 m/z);
 $[M+3H]^+ = 1065,6 \text{ m/z}$ (berechnet 1056,6 m/z); $[M+4H]^{2+} = 533,3 \text{ m/z}$
(berechnet 533,3 m/z)

Tabelle 11-5: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **42**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Einwaage [g]
7	Fmoc-NH-L-Hyp(PROXYL)-OH 23	2	0,321	0,168
8	3-Carboxy-PROXYL 8	2	0,321	0,06

11.7.7.Synthese von HN-Hyp(tBu)-Pro-Hyp(tBu)-Ser(tBu)-Hyp(PROXYL)-Lys(Boc)-Gly-CTC-Resin 70



70

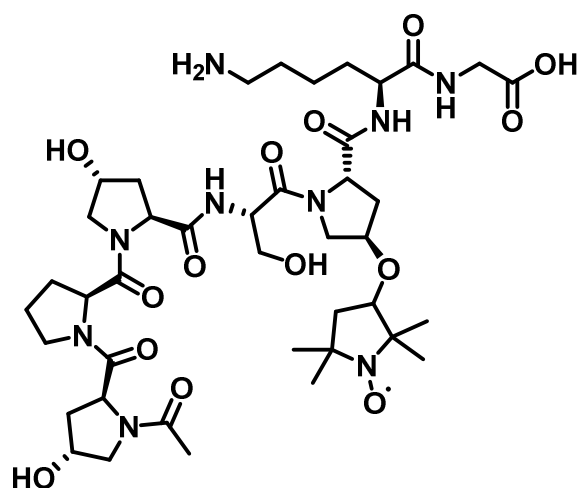
Die Synthese wurde nach AAV-3 ohne Harz-Abspaltung durchgeführt, wobei die Einwaagen der einzelnen Kopplungen aus Tabelle 11-6 entnommen werden können. In der angegebenen Reihenfolge wurden die Aminosäuren an das Chlorotrityl-Harz (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,23 g) gekoppelt.

Das erhaltene Rohprodukt **70** wurde für zwei unterschiedliche ergänzende Kopplungen geteilt.

Tabelle 11-6: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **70**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Einwaage [g]
1	Fmoc-Gly-OH	2	0,672	0,2
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2	0,672	0,315
3	Fmoc-NH-L-Hyp(PROXYL)-OH 23	2	0,672	0,35
4	Fmoc-NH-L-Ser(tBu)-OH	2	0,672	0,258
5	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,672	0,237
6	Fmoc-Pro-OH·H ₂ O	2	0,672	0,249
7	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,672	0,237

11.7.8.Synthese von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 41



41

Es wurden 0.280 g **70** (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,115 g CTC-Harz) verwendet, um ergänzende Kopplungen nach AAV-3 durchzuführen. Hierbei wurden die Einwaagen aus Tabelle 11-7 verwendet.

Es konnten 141 mg Rohprodukt **41** isoliert und anschließend mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 8 mL/min und einen Gradienten von 5 % auf 33 % Eluent A in 50 Minuten.

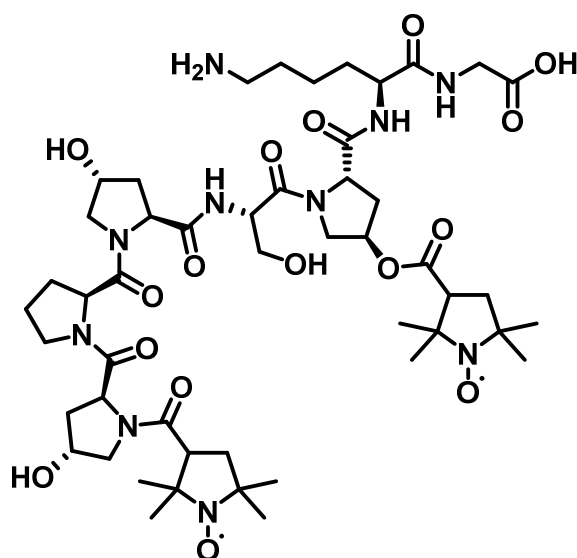
Das erhaltene Peptid **41** konnte mit 28 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 99 % isoliert werden.

HPLC: $t_R = 12,5 \text{ min}$; **ESI-MS:** $[M+1H]^+ = 937,5 \text{ m/z}$ (berechnet 937,5 m/z);
 $[M+2H]^+ = 938,5 \text{ m/z}$ (berechnet 938,5 m/z); $[M+3H]^{2+} = 469,7 \text{ m/z}$
(berechnet 469,7 m/z)

Tabelle 11-7: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **41**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge	Einwaage
			[mmol]	[g]
1	Essigsäureanhydrid	2	0,336	0,034

11.7.9.Synthese von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44



44

Es wurden 0,280 g **70** (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,115 g CTC-Harz) verwendet, um ergänzende Kopplungen nach AAV-3 durchzuführen. Hierbei wurden die Einwaagen aus Tabelle 11-8 verwendet.

Es konnten 155 mg Rohprodukt **44** isoliert und anschließend mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 8 mL/min und einen Gradienten von 5 % auf 33 % Eluent A in 50 Minuten.

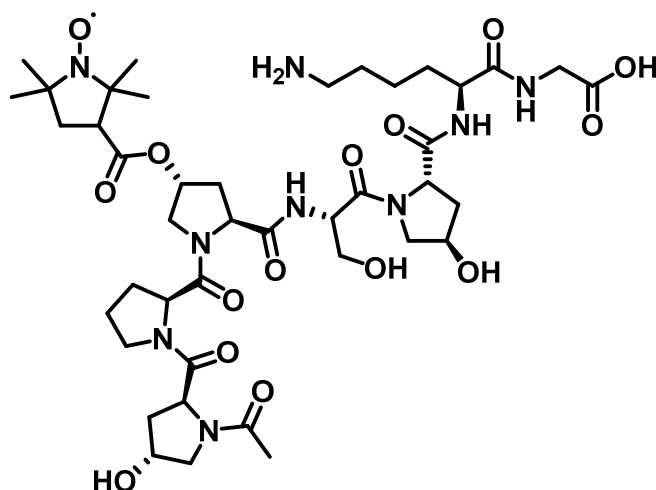
Das erhaltene Peptid **44** konnte mit 15 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 97 % isoliert werden.

HPLC: $t_R = 19,8 \text{ min}$; **ESI-MS:** $[M+2H]^+ = 1064,6 \text{ m/z}$ (berechnet 1064,6 m/z);
 $[M+3H]^+ = 1065,6 \text{ m/z}$ (berechnet 1056,6 m/z); $[M+4H]^{2+} = 533,3 \text{ m/z}$
(berechnet 533,3 m/z)

Tabelle 11-8: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **44**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Einwaage [g]
1	3-Carboxy-PROXYL	8	0,161	0,168

11.7.10. Synthese von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 40



40

Die Synthese wurde nach AAV-3 durchgeführt, wobei die Einwaagen der einzelnen Kopplungen aus Tabelle 11-9 entnommen werden können. In der angegebenen Reihenfolge wurden die Aminosäuren an das Chlorotrityl-Harz (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,1 g) durchgeführt.

Es konnten 111 mg Rohprodukt **40** isoliert und anschließend mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 8 mL/min und einen Gradienten von 5 % auf 33 % Eluent A in 50 Minuten.

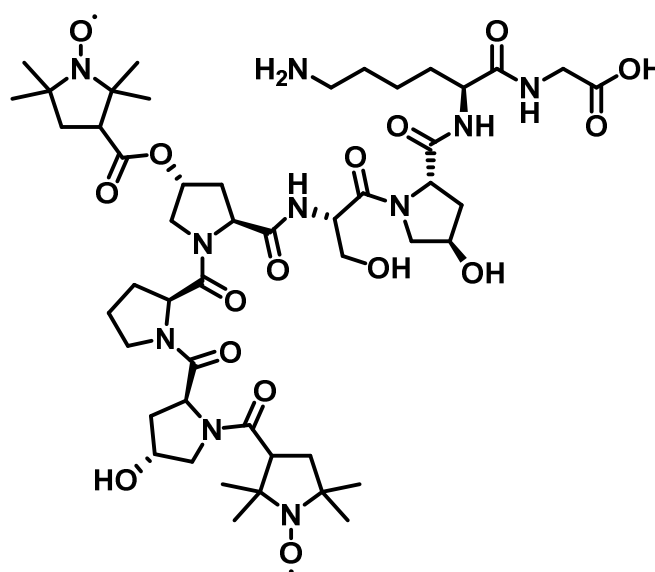
Das erhaltene Peptid **40** konnte mit 30 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 99% isoliert werden.

HPLC: $t_R = 15,9 \text{ min}$; **ESI-MS:** $[M+1H]^+ = 937,5 \text{ m/z}$ (berechnet 937,5 m/z); $[M+2H]^{2+} = 469,2 \text{ m/z}$ (berechnet 469,2 m/z)

Tabelle 11-9: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **40**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge	Einwaage
			[mmol]	[g]
1	Fmoc-Gly-OH	2	0,292	0,087
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2	0,292	0,137
3	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,292	0,103
4	Fmoc-NH-L-Ser(tBu)-OH	2	0,292	0,112
5	Fmoc-NH-L-Hyp(PROXYL)-OH 23	1,25	0,183	0,095
6	Fmoc-Pro-OH·H ₂ O	2	0,292	0,108
7	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,292	0,103
8	Essigsäureanhydrid	2	0,292	0,03

11.7.11. Synthese von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 43



43

Die Synthese wurde nach AAV-3 durchgeführt, wobei die Einwaagen der einzelnen Kopplungen aus Tabelle 11-10 entnommen werden können. In der angegebenen Reihenfolge wurden die Aminosäuren an das Chlorotrityl-Harz (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,21 g) gekoppelt.

Es konnten 111 mg Rohprodukt **43** isoliert und anschließend mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 8 mL/min und einen Gradienten von 5 % auf 33 % Eluent A in 50 Minuten.

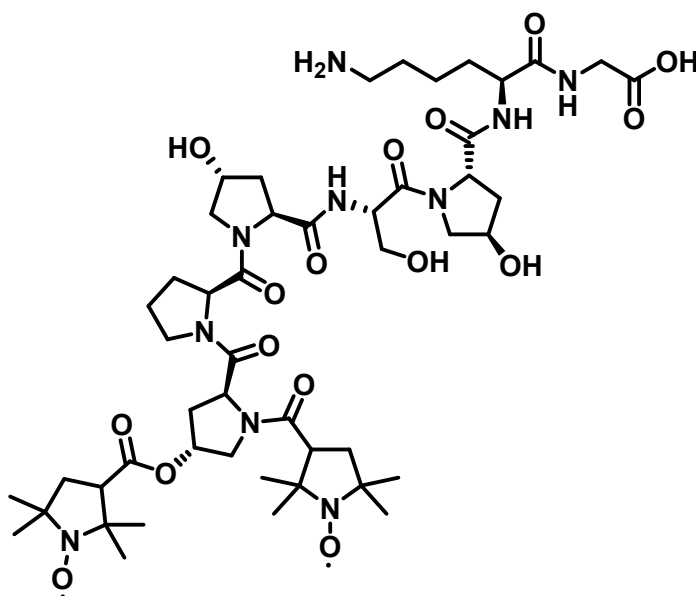
Das erhaltene Peptid **43** konnte mit 36 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 99% isoliert werden.

HPLC: $t_R = 21,0$ min; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 1062,6$ m/z (berechnet 1062,6 m/z); $[M+1H]^+ = 1063,6$ m/z (berechnet 1063,6 m/z); $[M+2H]^+ = 1064,6$ m/z (berechnet 1064,6 m/z); $[M+3H]^+ = 1065,6$ m/z (berechnet 1065,6 m/z); $[M+4H]^{2+} = 533,3$ m/z (berechnet 533,3 m/z); $[M+5H]^{3+} = 355,9$ m/z (berechnet 355,9 m/z).

Tabelle 11-10: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **43**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge	Einwaage
			[mmol]	[g]
1	Fmoc-Gly-OH	2	0,613	0,182
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2	0,613	0,287
3	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,613	0,217
4	Fmoc-NH-L-Ser(tBu)-OH	2	0,613	0,235
5	Fmoc-NH-L-Hyp(PROXYL)-OH 23	2	0,613	0,32
6	Fmoc-Pro-OH·H ₂ O	2	0,613	0,227
7	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,613	0,217
8	3-Carboxy-PROXYL 8	2	0,613	0,114

11.7.12. Erneute Synthese von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42



42

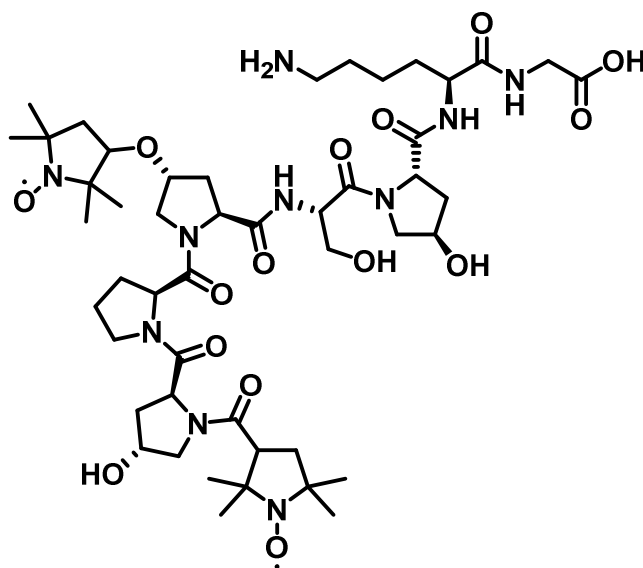
Die Synthese wurde nach AAV-3 durchgeführt, wobei die Einwaagen der einzelnen Kopplungen aus Tabelle 11-11 entnommen werden können. In der angegebenen Reihenfolge wurden die Aminosäuren an das Chlorotrityl-Harz (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,102 g) gekoppelt. Es konnten 37 mg Rohprodukt **42** isoliert und anschließend mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 9 mL/min und einen Gradienten von 0 % auf 50 % Eluent A in 60 Minuten. Das erhaltene Peptid **42** konnte mit 3 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 99% isoliert werden.

HPLC: $t_R = 22,3 \text{ min}$; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 1063,6 \text{ m/z}$ (berechnet $1063,6 \text{ m/z}$);
 $[M+2H]^{2+} = 532,8 \text{ m/z}$ (berechnet $532,8 \text{ m/z}$)

Tabelle 11-11: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **42**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Einwaage [g]
1	Fmoc-Gly-OH	2	0,298	0,089
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2	0,298	0,14
3	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,298	0,122
4	Fmoc-NH-L-Ser(tBu)-OH	2	0,298	0,114
5	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,298	0,122
6	Fmoc-Pro-OH·H ₂ O	2	0,298	0,106
7	Fmoc-NH-L-Hyp(PROXYL)-OH 23	2	0,298	0,155
8	3-Carboxy-PROXYL 8	2	0,298	0,056

11.7.13. Erneute Synthese von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly **43**



43

Die Synthese wurde nach AAV-3 durchgeführt, wobei die Einwaagen der einzelnen Kopplungen aus Tabelle 11-12 entnommen werden können. In der angegebenen Reihenfolge wurden die Aminosäuren an das Chlorotrityl-Harz (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,102 g) gekoppelt. Es konnten 43 mg Rohprodukt **43** isoliert und anschließend mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 9 mL/min und einen Gradienten von 0 % auf 50 % Eluent A in 60 Minuten.

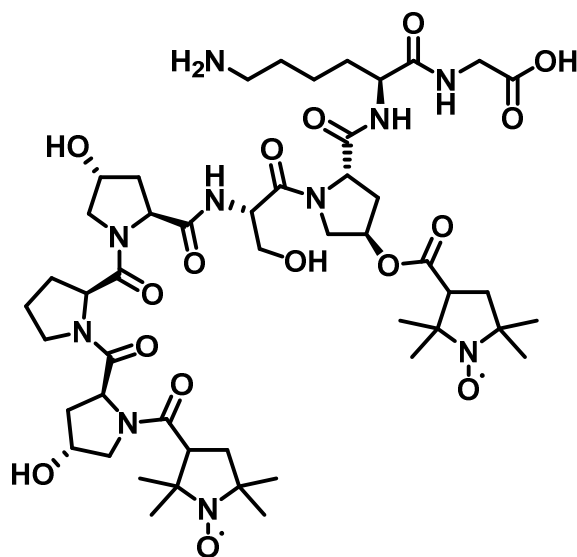
Das erhaltene Peptid **43** konnte mit 8 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 99% isoliert werden.

HPLC: $t_R = 20,4$ min; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 1063,6$ m/z (berechnet 1063,6 m/z);
 $[M+2H]^{2+} = 532,8$ m/z (berechnet 532,8 m/z); $[M+4H]^{3+} = 355,9$ m/z
(berechnet 355,9 m/z)

Tabelle 11-12: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **43**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Einwaage [g]
1	Fmoc-Gly-OH	2	0,298	0,089
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2	0,298	0,14
3	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,298	0,122
4	Fmoc-NH-L-Ser(tBu)-OH	2	0,298	0,114
5	Fmoc-NH-L-Hyp(PROXYL)-OH 23	2	0,298	0,155
6	Fmoc-Pro-OH·H ₂ O	2	0,298	0,106
7	Fmoc-NH-L-Hyp-OH	2	0,298	0,122
8	3-Carboxy-PROXYL 8	2	0,298	0,056

11.7.14. Erneute Synthese von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44



33

Die Synthese wurde nach AAV-3 durchgeführt, wobei die Einwaagen der einzelnen Kopplungen aus Tabelle 11-13 entnommen werden können. In der angegebenen Reihenfolge wurden die Aminosäuren an das Chlorotrityl-Harz (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,102 g) gekoppelt.

Es konnten 28 mg Rohprodukt **44** isoliert und anschließend mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 9 mL/min und einen Gradienten von 0 % auf 50 % Eluent A in 60 Minuten.

Das erhaltene Peptid **44** konnte mit 7 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 99% isoliert werden.

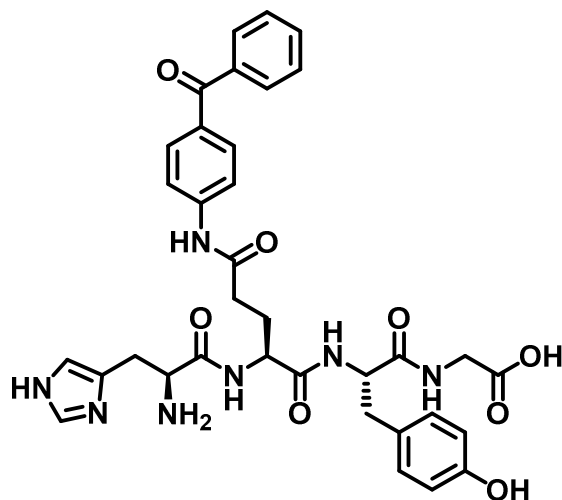
HPLC: $t_R = 20,1$ min; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 1063,6$ m/z (berechnet 1063,6 m/z);
 $[M+2H]^{2+} = 532,8$ m/z (berechnet 532,8 m/z); $[M+4H]^{3+} = 355,9$ m/z
(berechnet 355,9 m/z)

Tabelle 11-13: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **44**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Einwaage [g]
1	Fmoc-Gly-OH	2	0,298	0,089
2	Fmoc-Lys(Boc)-OH	2	0,298	0,14
3	Fmoc-NH-L-Hyp(PROXYL)-OH 23	2	0,298	0,155
4	Fmoc-NH-L-Ser(tBu)-OH	2	0,298	0,114
5	Fmoc-NH-L-Hyp(tBu)-OH	2	0,298	0,122
6	Fmoc-Pro-OH·H ₂ O	2	0,298	0,106
7	Fmoc-NH-L-Hyp-OH	2	0,298	0,122
8	3-Carboxy-PROXYL 8	2	0,298	0,056

11.8. Synthese eines Benzophenon-funktionalisierten Tetra-Peptides und dessen Referenzpeptides

11.8.1. Synthese von NH-His-Glu(NH-Benzophenon)-Tyr-Gly-OH **45**



45

Die Synthese wurde nach AAV-3 durchgeführt, wobei die Einwaagen der einzelnen Kopplungen aus Tabelle 11-14 entnommen werden können. In der angegebenen Reihenfolge wurden die Aminosäuren an das Chlorotrityl-Harz (1 Äq., 1.46 mMol/g, 0.3 g) gekoppelt.

Es konnten 290 mg Rohprodukt **45** isoliert und anschließend mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 9 mL/min und einen Gradienten von 0 % auf 50 % Eluent A in 60 Minuten.

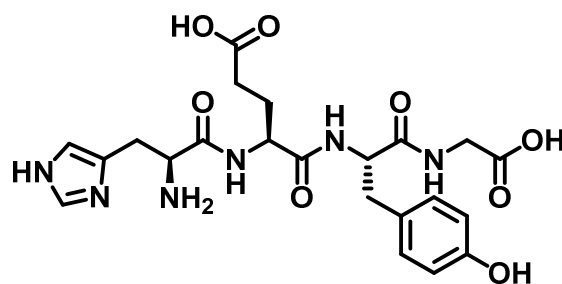
Das erhaltene Peptid **45** konnte mit 101 mg als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 99% isoliert werden.

HPLC: $t_R = 20,6$ min; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 684,3$ m/z (berechnet 684,3 m/z).

Tabelle 11-14: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **45**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge	Einwaage
			[mmol]	[g]
1	Fmoc-Gly-OH	2	0,876	0,26
2	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	2	0,876	0,403
3	Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH 25	2	0,876	0,481
4	Fmoc-His(Trt)-OH	2	0,876	0,543

11.8.2.Synthese von NH-His-Glu-Tyr-Gly-OH **46**



46

Die Synthese wurde nach AAV-3 durchgeführt, wobei die Einwaagen der einzelnen Kopplungen aus Tabelle 11-15 entnommen werden können. In der angegebenen Reihenfolge wurden die Aminosäuren an das Chlorotrityl-Harz (1 Äq., 1,46 mMol/g, 0,2 g) gekoppelt. Es konnten 100 mg des Peptids **46** als weißer Feststoff mit einer Reinheit von > 99 % isoliert werden.

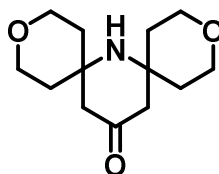
HPLC: $t_R = 10,1$ min; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 505,2$ m/z (berechnet 505,2 m/z).

Tabelle 11-15: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von **46**.

Kopplung	Aminosäure	Äquivalente	Stoffmenge [mmol]	Einwaage [g]
1	Fmoc-Gly-OH	2	0,584	0,174
2	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	2	0,584	0,268
3	Fmoc-NH-L-Glu-OH · H ₂ O	2	0,584	0,259
4	Fmoc-His(Trt)-OH	2	0,584	0,362

11.9. Synthese eines Amin-funktionalisierten Dispiro-Nitroxyl-Radikals

11.9.1.Synthese von 3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on **51**



51

Die Synthese wurde analog zur Literatur durchgeführt.²²⁶

1,2,2,6,6-Pentamethyl-4-piperidione **50** (1 Äq., 127,61 mMol, 21,6 g) wurde in 140 mL DMSO (absolutiert) unter Argon-Atmosphäre und Tetrahydro-4H-pyran-4-one **53** (383 mMol, 3,00 Äq., 382,8 mMol, 38,4 g) sowie Ammoniumchlorid (0,766 mol, 6,00 Äq., 766 mMol,

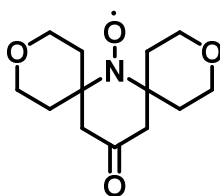
40,96 g)) hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde für 48 h auf 60°C erhitzt. Anschließend wurden 400 mL Wasser hinzugegeben und die Lösung mit 30 mL 2N HCl angesäuert. Die Lösung wurde drei Mal mit 100 mL Diethylether extrahiert und die wässrige Phase mit gesättigter K₂CO₃-Lösung basisch gestellt. Die wässrige Phase wurde vier Mal mit Chloroform extrahiert, mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der gelb/braune Rückstand wurde über eine kurze Fritte gereinigt: Das Produkt **51** wurde aufgetragen und mit PE:EE 1:1 (v/v) zunächst alle Verunreinigungen herausgewaschen. Anschließend wurde das Produkt **51** mit reinem Ethylacetat eluiert. Das Produkt **51** wurde als Gemisch aus einer einfach und zweifach substituierten Struktur erhalten. Dieses Gemisch wurde in der weiteren Oxidation eingesetzt und anschließend abgetrennt.

Für die Isolierung der reinen Struktur **51** wurde das Gemisch in Petrolether erhitzt und Ethylacetat zugegeben, solange bis nur noch ein farbloser Rückstand zurückbleibt. Dieser wurde abfiltriert und getrocknet.

Es werden 9,50 g des Gemisches als kristalliner, brauner Feststoff erhalten, welcher ohne weitere Reinigung in der folgenden Oxidation eingesetzt wurde.

R_f (Ethylacetate): 0,25 ESI-MS: [M+H]⁺ = 255,2 m/z (berechnet 255,2 m/z); ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ[ppm] = 3,87, 3,59, 2,42, 1,65, 1,32 ppm.; ¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ[ppm] = 63,95, 55,03, 52,28 ppm.

11.9.2.Synthese von 7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on **52**



52

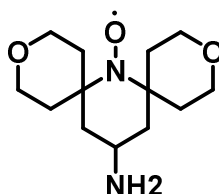
Die Synthese wurde analog zur Literatur durchgeführt.²²⁶

51 (1 Äq., 39,7 mMol, 9,5 g) wurde als Gemisch in 150 mL DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde Na₂WO₄·2H₂O (3,97 mMol, 0,1 Äq., 3,97 mMol, 1,3 g) und mCPBA **73** (1,80 Äq., 71,46 mMol, 16,01 g) zugegeben. Die Kühlung wurde entfernt und die Lösung wurde für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde gesättigte NaHCO₃-Lösung zugegeben und die Phasen getrennt. Die organische Phase wurde bis zur Peroxidfreiheit mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde mit Brine gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde

säulenchromatographisch mit EE/PE 1:1 (v/v) aufgereinigt. Es wurden 2,9 g eines gelben, kristallinen Feststoffs **52** erhalten.

R_f (Ethylacetat:Petrolether = 1:1): 0,20 **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 255,2 \text{ m/z}$ (berechnet 255,2 m/z)

11.9.3.Synthese von 15-amino-7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan **47**



47

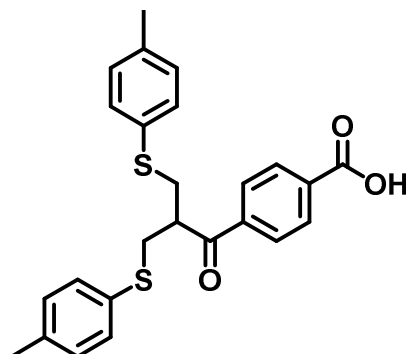
Die Synthese wurde analog zur Literatur durchgeführt.²²⁶

Ammoniumacetat 8,8 g (10 Äq., 114,03 mMol, 8,8 g) wurde in 50 mL trockenem Methanol unter Ar-Atmosphäre vorgelegt. Anschließend wurde **52** (1 Äq, 11,44 mMol, 2,90 g) zugegeben und bis zum vollständigen Umsatz bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde $\text{Na}(\text{CN})\text{BH}_3$ (15,97 mMol, 1,4 Äq., 15,97 mMol, 1,02 g) zugegeben und für 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 10 mL einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung hinzugegeben und das Lösungsmittel unter reduzierten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in Chloroform/Wasser aufgenommen und extrahiert. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit Chloroform extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit Brine gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter reduzierten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch mit DCM:Methanol 9:1 (v/v) als Laufmittel aufgereinigt. Es wurden 450 mg eines rötlichen Feststoffs **47** des Dispiro-Radikal-Amins erhalten.

R_f (DCM:Methanol = 9:1): 0,10 **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 240,2 \text{ m/z}$ (berechnet 240,2 m/z)

11.10. Synthese einer Bissulfon-basierten Radikal- und einer Allyl-Markierung für Interkalationsreaktionen in Disulfidbindungen von Biomolekülen

11.10.1. Synthese von Bisthioether 55



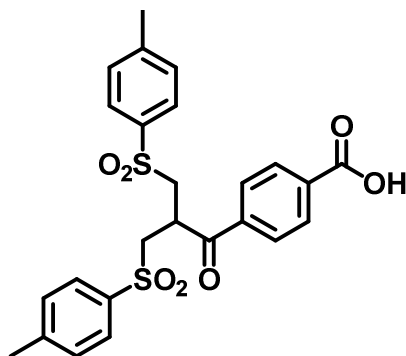
55

Die Synthese wurde analog zur Literatur und in Kooperation mit dem Arbeitskreis Reggeline durchgeführt.²²⁷ 4-Acetylbenzoic acid **7** (1,0 Äq., 34,48 mMol, 5,66 g), Paraformaldehyd **74** (4,84 Äq., 167,0 mMol, 5,01 g) und Dimethylammoniumchlorid (4,84 Äq., 167,0 mMol, 13,62 g) wurden in Isopropanol gelöst und unter Reflux für 24 Stunden gerührt. Beim Abkühlen entstand ein Niederschlag, der durch Zugabe von Wasser aufgelöst wurde. Nach Zugabe von 4-Methylbenzenethiol **75** (2,0 Äq., 68,95 mMol, 8,56 g) wurde unter Argon-Atmosphäre und Reflux weitere 24 Stunden gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der ausgefallene Feststoff filtriert, mit Wasser gewaschen, getrocknet und in Methanol umkristallisiert, um 9,47 g **55** als farblosen Feststoff zu erhalten

¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 11,11, 8,05, 7,64, 7,14, 7,08, 3,83, 3,23, 2,36;

¹³C-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ [ppm] = 200,6, 171,28, 140,72, 137,35, 133,04, 131,65, 131,21, 130,4, 129,97, 128,44, 46,04, 36,51, 21,22; M_p: 137,5-140,0 °C.

11.10.2. Synthese von Bissulfon 56



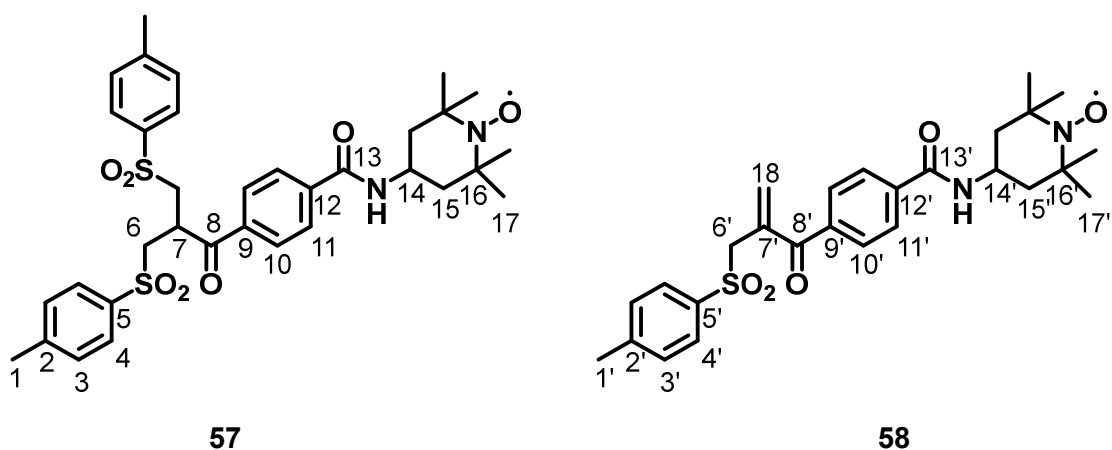
56

Die Synthese wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis Reggeline durchgeführt. Bisthioether **55** (1,0 Äq., 6,87 mMol, 3,0 g) wurde in 100 mL Essigsäure gelöst und bei 30 °C gerührt.¹⁹⁵

Anschließend wurde H₂O₂ (30-35 %) (6,5 Äq., 44,67 mMol, 4,56 mL) hinzugefügt und die Mischung über Nacht gerührt. Es wurde Diethylether (50 mL) und Wasser (100 mL) hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde weitere zwei Mal extrahiert und anschließend die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaHSO₃-Lösung und Brine gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde in Wasser umkristallisiert und 2,6 g Bissulfon **56** als ein farbloser Feststoff erhalten.

¹H-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ[ppm] = 13,36, 7,93, 7,58, 7,55, 7,45, 7,45, 3,99, 3,88-3,71, 2,45; ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 300 MHz): δ[ppm] = 195,56, 166,38, 145,09, 137,72, 135,03, 130,06, 129,4, 128,15, 127,81, 55,03, 35,37, 21,07; M_p: 169,0-172,5 °C.

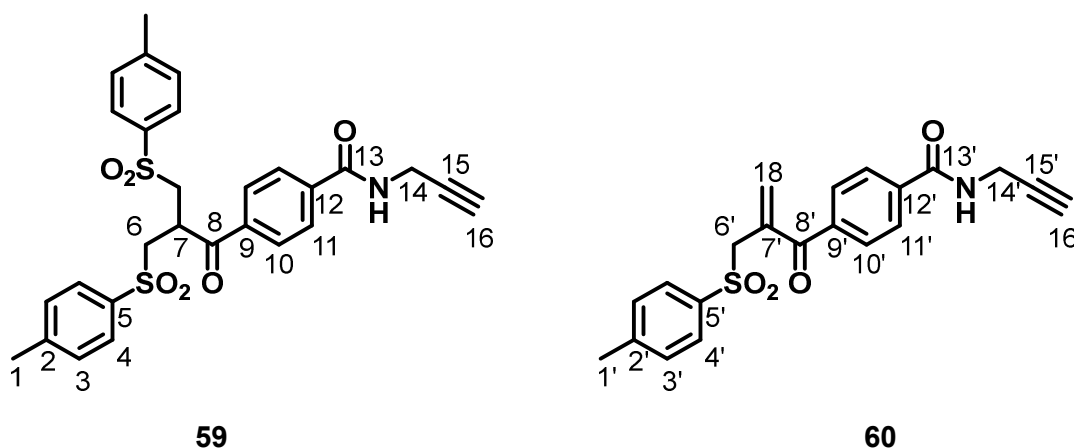
11.10.3. Synthese der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung **57** und **58**



Die Synthese wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis Reggelin durchgeführt. Bissulfon **56** (1,0 Äq., 0,99 mMol, 500 mg) und *N*-methylmorpholine **76** (2,0 Äq., 1,99 mMol, 0,22 mL) wurden in 25 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde HOBT (1-Hydroxybenzotriazol) (1,1 Äq., 1,099 mMol, 148,5 mg) und EDC·HCl **19** (1,2 Äq., 1,20 mMol, 229,8 mg) hinzugegeben und die Reaktion bei 0 °C gerührt bis Dünnschichtchromatographie-Analyse eine vollständige Umsetzung zeigt. Amino-Tempo **77** (1,0 Äq., 0,99 mMol, 171 mg) wurde hinzugegeben, die Kühlung entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 50 mL Wasser hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde weitere zwei Mal extrahiert und anschließend die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaHSO₃-Lösung und Brine gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie auf Silica (EA:PE 2:1 (v/v)) aufgereinigt. Es wurden 437 mg Bissulfon-basierte Radikal-Markierung als Mischung von Bissulfon **57** und Allylsulfon **58** als ein oranger Feststoff erhalten.

R_f (EA:PE/2:1): 0,36 (Allylsulfone), 0,4 (Bissulfon); $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 300 MHz, äquimolare Menge Ascorbin-Säure): $\delta[\text{ppm}] = 7,92$ (d, 2-H10, $3J = 8,43$ Hz), $7,82$ (d, 2-H10, $3J = 8,59$ Hz), $7,75$ (d, 2-H11', $3J = 8,43$ Hz), $7,65$ (d, 4-H4, $3J = 8,31$ Hz), $7,59$ (d, 2-H11, $3J = 8,59$ Hz), $7,45$ (d, 4-H3, $3J = 8,31$ Hz), $6,19$ (s, 1-H18), $5,99$ (s, 1-H18), $4,50$ (d, 1-NH), $4,48$ (m [overlapping], 1-H14), $4,31$ - $4,23$ (m, 1-H7), $3,83$ - $3,76$ (m, 4-H6, 6'), $3,69$ - $3,63$ (m, 4-H6, 6'), $2,52$ (s, 6-H1, 1'), $2,01$ - $1,95$ (m, 3-H15, 15'), $1,76$ - $1,66$ (m, 3-H15, 15'), $1,32$ (d, 18-H17, 17'); $^{13}\text{C-NMR}$ (MeOH- d_4 , 300 MHz, äquimolare Menge Ascorbin-Säure): $\delta[\text{ppm}] = 196,7$ (8-C), $173,5$ (13-C), $147,1$ (5-C), $146,5$ (12-C), $138,2$ (9-C), $136,4$ (2-C), $130,1$ (3-C), $128,7$ (11-C), $128,1$ (4-C), $127,8$ (10-C), $61,5$ (16-C), $56,4$ (6-C), $44,5$ (15-C), $42,4$ (14-C), $37,9$ (7-C), $30,9$ (17-C), $20,4$ (1-C); **HPLC**: **58** $t_R = 16,1$ min und **57** mit $t_R = 18,3$ min;

11.10.4. Synthese der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung 59 und 60

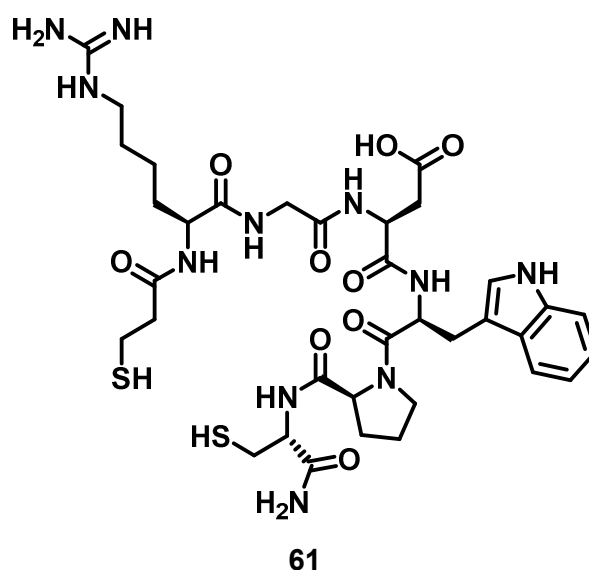


Die Synthese wurde in Kooperation mit Arbeitskreis Reggelin durchgeführt. Bissulfon **56** (1,0 Äq., 0,99 mMol, 500 mg) und *N*-methylmorpholin **76** (2,0 Äq., 1,99 mMol, 0,22 mL) wurden in 22 mL Dichlormethan gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde HOBt (1,1 Äq., 1,099 mMol, 148,5 mg) und EDC·HCl **19** (1,2 Äq., 1,20 mMol, 229,8 mg) hinzugegeben und die Reaktion bei 0 °C gerührt bis Dünnschichtchromatographie-Analysen eine vollständige Umsetzung zeigt. Propargylamin **78** (1,0 Äq., 0,99 mMol, 230 mg) wurde hinzugegeben, die Kühlung entfernt und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Es wurde 50 mL Wasser hinzugegeben und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde weitere zwei Mal extrahiert und anschließend die vereinten organischen Phasen mit gesättigter NaHSO₃-Lösung und Brine gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Chromatographie auf Silica (EA:PE/1:1) aufgereinigt. 230 mg Bissulfon-basierten Allyl-Markierung als Mischung von Bissulfon **59** und Allylsulfon **60** als ein farbloser Feststoff erhalten.

R_f (EA:PE/1:1): 0,2 (Allylsulfone), 0,3 (Bissulfon); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta[\text{ppm}] = 7,84$ (d, $3J = 8,38$ Hz, 1-H10), $7,78$ (d, $3J = 8,13$ Hz, 1-H10'), $7,77$ (d, $3J = 8,38$ Hz, 1-H11), $7,72$ (d, $3J = 8,13$ Hz, 1-H11'), $7,69$ (m, 6-H4, 4'), $7,35$ (d, 6-H3, 3', $3J = 8,31$ Hz), $6,51$ (t, 1-NH), $6,47$ (t, 1-NH), $6,26$ (s, 1-H17), $5,97$ (s, 1-H17), $4,34$ (p, 1-H7), $4,33$ (s, 2-H6'), $4,28$ - $4,24$ (m, 4-H14, 14'), $3,66$ - $3,44$ (m, 4-H6), $2,47$ (s, 6-H1), $2,41$ (s, 3-H1'), $2,33$ - $2,28$ (m, 2-H16, 16'); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta[\text{ppm}] = 195,3$ (8-C), $194,2$ (8'-C), $166,2$ (13-C), $165,5$ (13'-C), $145,7$ (5-C), $145,3$ (5'-C), $139,2$ (12-C), $137,3$ (12'-C), $136,8$ (7'-C), $136,0$ (9'-C), $135,9$ (9-C), $135,4$ (Σ 2, 2'-C), $134,5$ (17-C), $130,3$ (3-C), $130,1$ (3'-C), $129,9$ (11'-C), $128,9$ (11-C), $128,4$ (Σ 4-C, 4'-C), $127,7$ (10'-C), $127,1$ (10-C), $79,2$ (15-C), $79,1$ (15'-C), $72,4$ (16-C), $72,3$ (16'-C), $57,8$ (6'-C), $55,8$ (6-C), $35,7$ (7-C), $30,1$ (Σ 14-C, 14'-C), $21,9$ (1-C), $21,8$ (1'-C); **HPLC**: **60** $t_R = 14,0$ min und **59** mit $t_R = 16,7$ min;

11.11. Radikal- und Allyl-Markierung in die Disulfidbindung von Eptifibatid mittels Bissulfon-basierten Markierungen durch Interkalationsreaktion

11.11.1. Reduzierung von Eptifibatid zum Thiol 61



Die Synthese wurde in Kooperation mit dem Arbeitskreis Reggeline durchgeführt. Eptifibatid **54** 28 mg (1,0 Äq., 33 μmol , 28 mg) wurde in 5,0 mL Acetonitril und 5 mL anal. pur. Wasser gelöst. Anschließend wurde Dithiothreitol **63** (4,0 Äq., 132 μmol , 20,6 mg) hinzugegeben und die Mischung für 21 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Eine weitere Zugabe von **63** (2,0 Äq., 66 μmol , 10,2 mg) wurde hinzugegeben und für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei

HPLC: $t_R = 7,9 \text{ min}$; **ESI-MS:** $[M]^+ = 834,34 \text{ m/z}$ (berechnet $834,34 \text{ m/z}$),
 $[M+2H]^{2+} = 428,7 \text{ m/z}$ (berechnet $828,7 \text{ m/z}$)

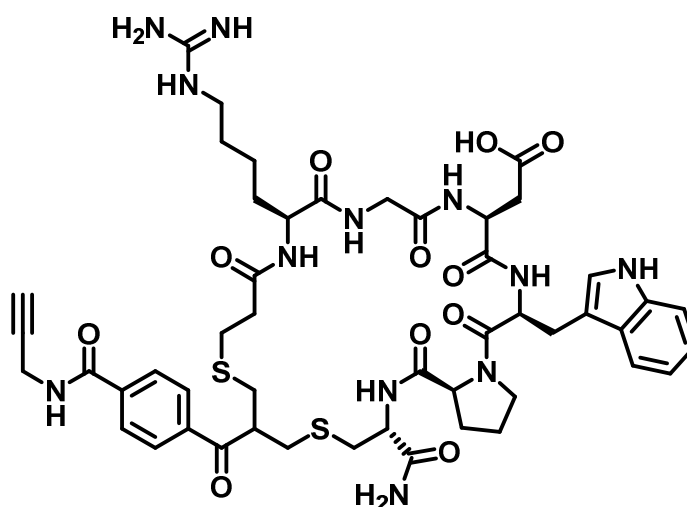
CC1(C)CC(C(C1)N(C)C)C(=O)Nc2ccc(cc2)C(=O)CCSCC(=O)N[C@H]3CC[C@@H](C(=O)N3)CSCC(=O)C(C)C(=O)N[C@@H](Cc4c[nH]c5ccccc45)C(=O)N[C@@H](Cc6c[nH]c7ccccc67)C(=O)NCC(=O)N[C@@H](CCCCNC(=N)N)C(=O)NCC(=O)N[C@@H](CC(=O)O)C(=O)N

Die Synthese wurde analog zur Literatur und in Kooperation mit dem Arbeitskreis Reggelen durchgeführt.²²⁷ Die Bissulfon-basierte Radikal-Markierung wird als Mischung von Bissulfon **57** und Allylsulfon **58** (2,0 Äq., 22 µmol, 14,4 mg) in 3,9 mL Acetonitril und 6 mL Phosphatpuffer (pH = 7,8, c = 50 mM) für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde reduziertes Eptifibatid **54** (1,0 Äq., 11 µmol, 9,0 mg) 1,8 mL Acetonitril und 2,7 mL Phosphatpuffer gelöst und die Mischung für weitere 24 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 9 mL/min und einen Gradienten von 0 % auf 50 % Eluent A in 60 Minuten. Es konnten 4,8 mg des Radikal-markierten Eptifibatids **62** als weißer Feststoff erhalten werden.

HPLC: $t_R = 10,7$ min; **ESI-MS:** $[M+H]^+ = 1175,5$ m/z (berechnet 1175,5 m/z),
 $[M+2H]^{2+} = 588,3$ m/z (berechnet 588,3 m/z).

11.11.3. Synthese von Allyl-markiertem Eptifibatid durch Interkalationsreaktion

68



68

Die Synthese wurde analog zur Literatur und in Kooperation mit dem Arbeitskreis Reggelin durchgeführt.²²⁷ Die Bissulfon-basierte Allyl-Markierung wird als Mischung von Bissulfon **59** und Allylsulfon **60** (2,0 Äq., 22 μ mol, 14,4 mg) in 3,9 mL Acetonitril und 6 mL Phosphatpuffer (pH = 7,8, c = 50 mM) für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde reduziertes Eptifibatid **54** (1,0 Äq., 11 μ mol, 9,0 mg) 1,8 mL Acetonitril und 2,7 mL Phosphatpuffer gelöst und die Mischung für weitere 24 Stunden gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und das erhaltene Rohprodukt mittels präparativer HPLC-Analytik aufgereinigt werden. Hierbei hatte die Trennmethode eine Flussrate von 9 mL/min und einen Gradienten von 0 % auf 50 % Eluent A in 60 Minuten. Es konnten 1,5 mg des Allyl-markierten Eptifibatids **68** als weißer Feststoff erhalten werden.

HPLC: t_R = 9,4 min; **ESI-MS:** $[M]^+ = 1059,4$ m/z (berechnet 1059,4 m/z), $[M+2H]^{2+} = 530,2$ m/z (berechnet 530,2 m/z).



12. Anhang

12.1. HPLC-, MS- und NMR-Daten von Fmoc-*N*-Hyp(OH)-O^tBu 15

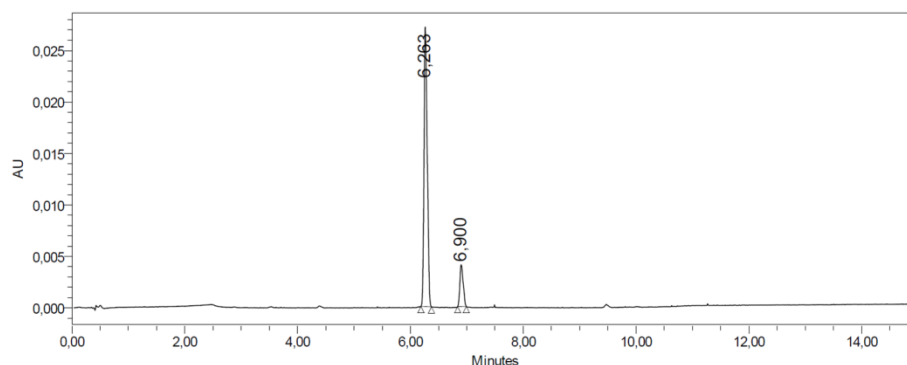


Abbildung 12-1: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-*N*-Hyp(OH)-O^tButyl 15 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

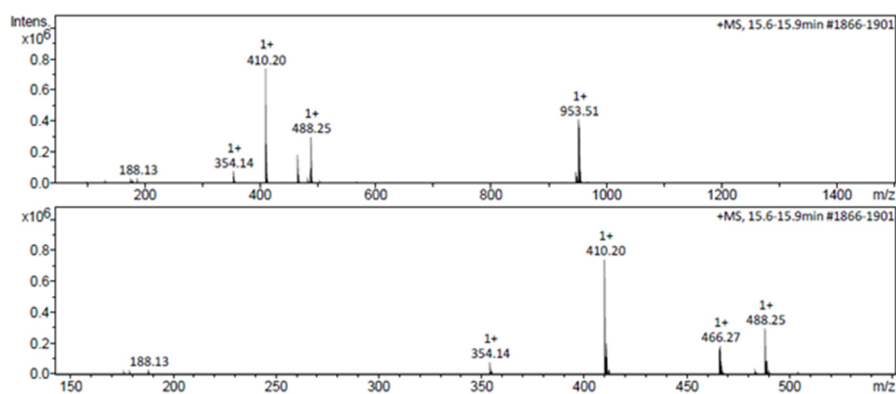


Abbildung 12-2: ESI-MS von Fmoc-*N*-Hyp(OH)-O^tButyl 15.

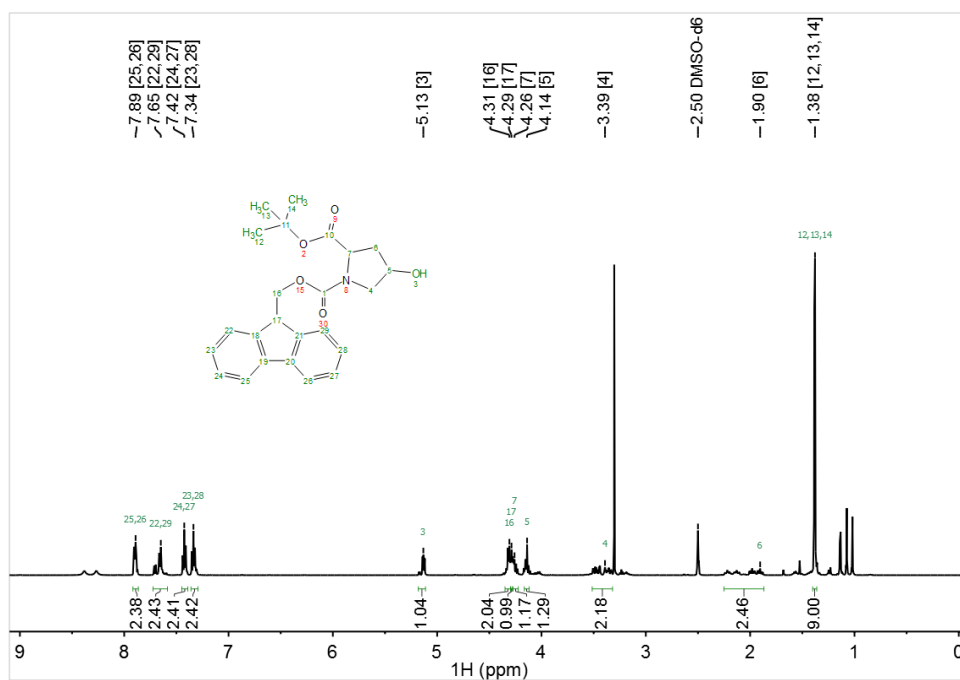


Abbildung 12-3: ¹H-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-O-Butyl 15.

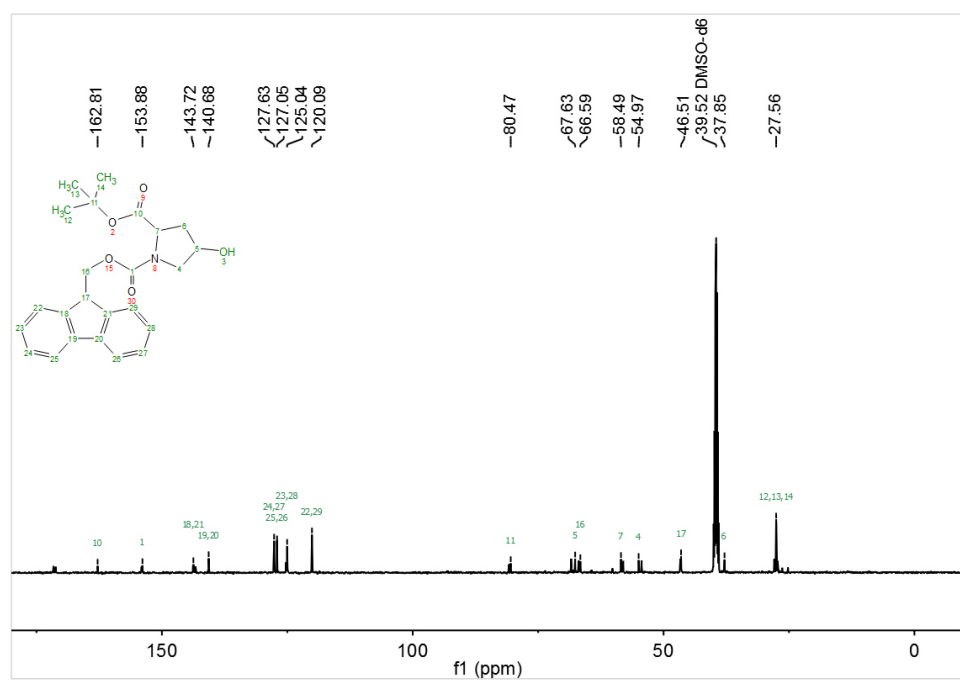


Abbildung 12-4: ¹³C-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-O-Butyl 15.

12.2. HPLC-, MS- und NMR-Daten von Fmoc-N^H-L-Serin(OH)-O^tButyl 16

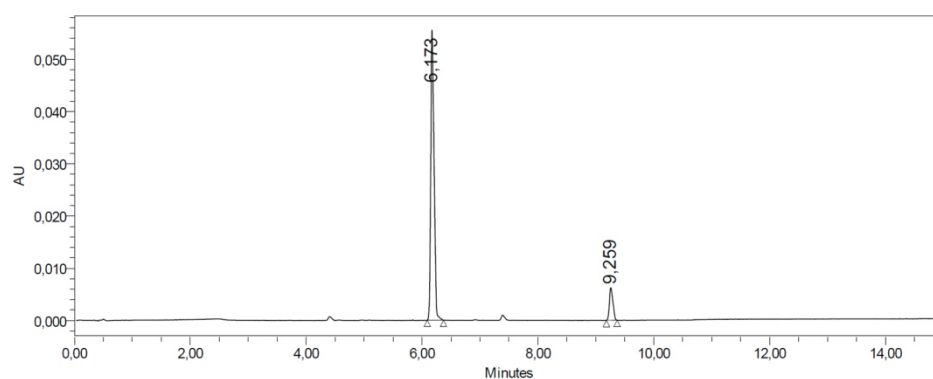


Abbildung 12-5: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-N^H-L-Serin(OH)-O^tButyl 16 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

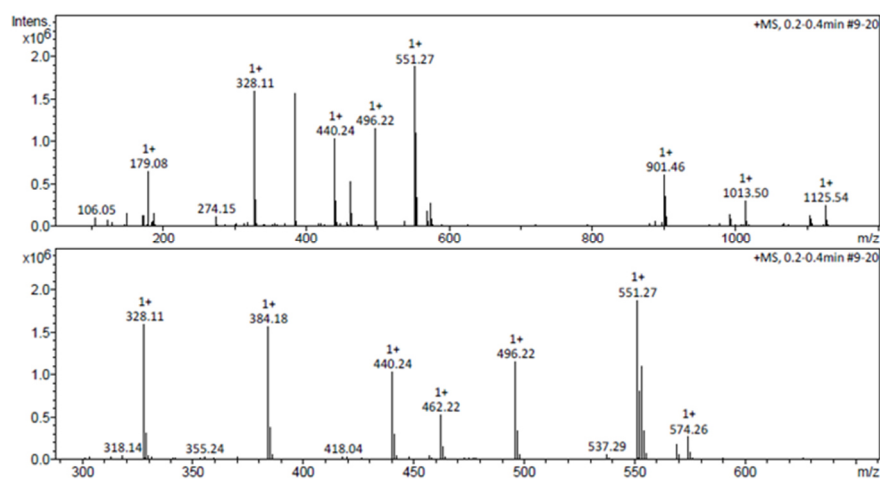


Abbildung 12-6: ESI-MS von Fmoc-N^H-L-Serin(OH)-O^tButyl 16.

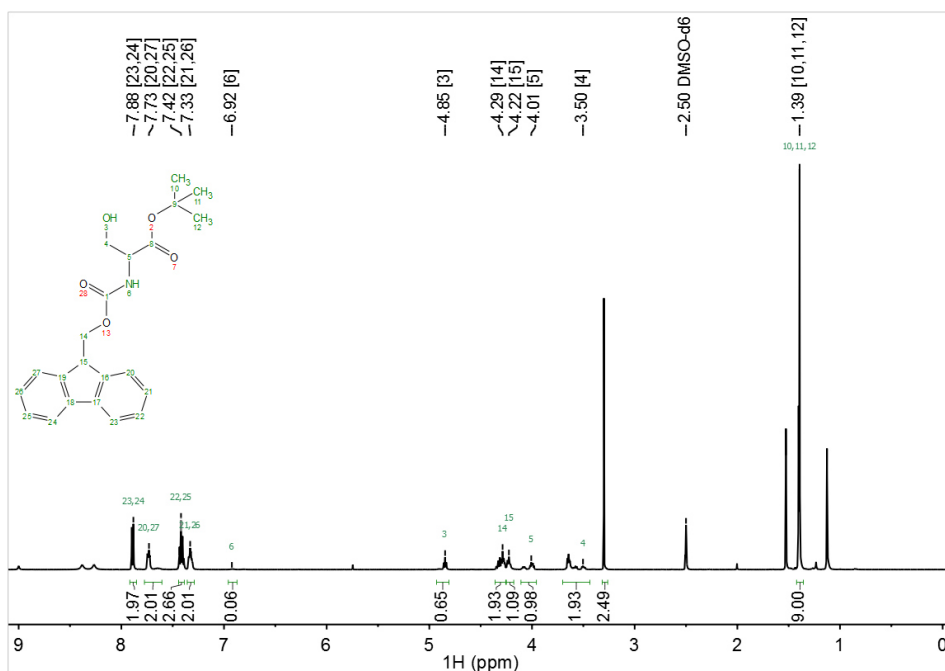


Abbildung 12-7: ¹H-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Serin(OH)-O-Butyl 16.

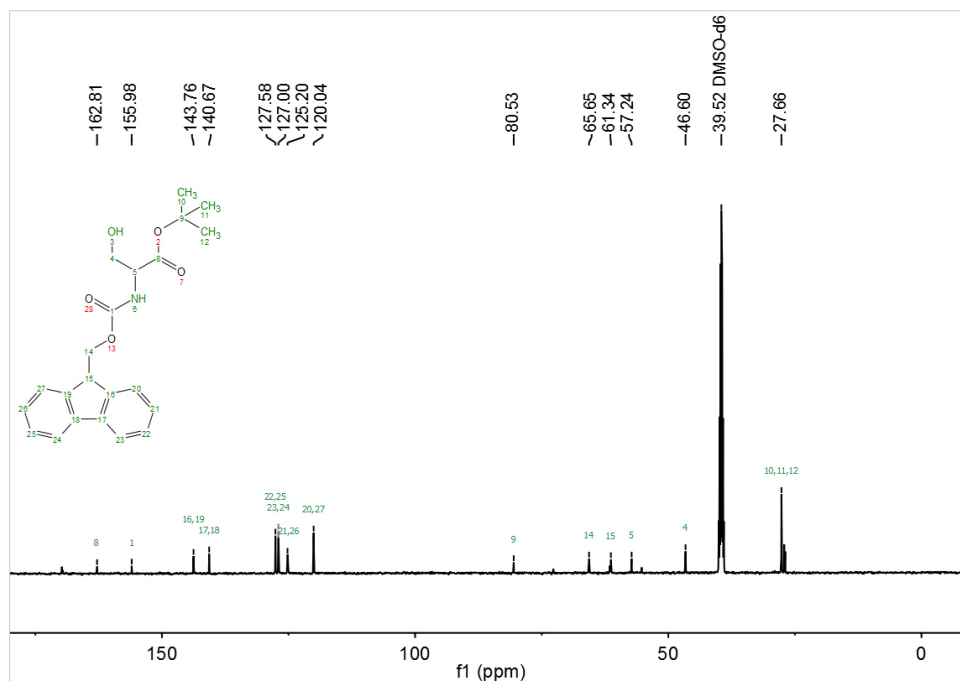


Abbildung 12-8: ¹³C-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Serin(OH)-O-Butyl 16.

12.3. HPLC-, MS- und NMR-Daten von Fmoc-*N*-H-L-Tyrosin(OH)-O^tButyl 17

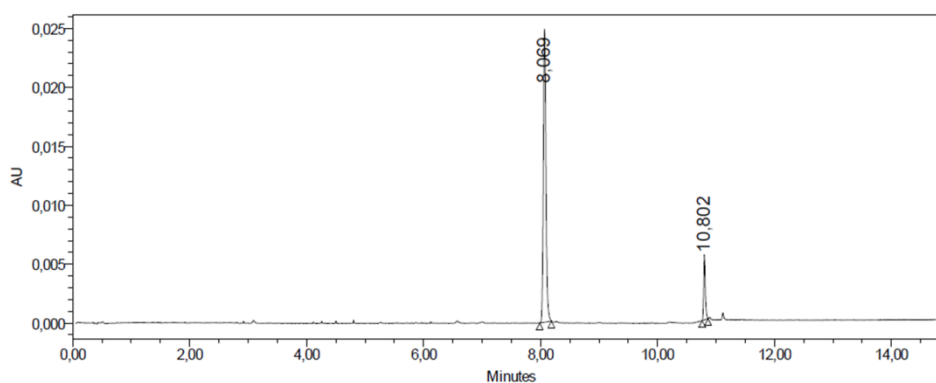


Abbildung 12-9: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-*N*-H-L-Tyrosin(OH)-O^tButyl 17 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

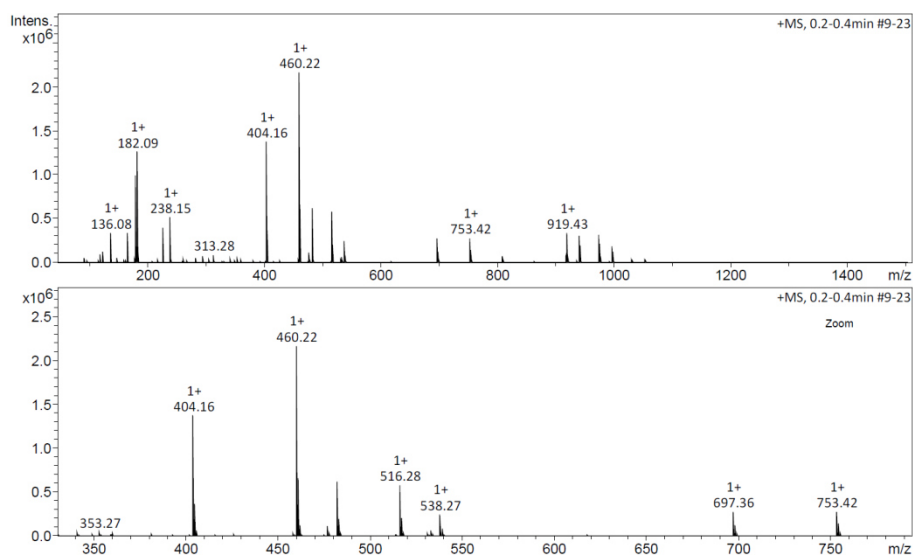


Abbildung 12-10: ESI-MS und Zoom von Fmoc-*N*-H-L-Tyrosin(OH)-O^tButyl 17.

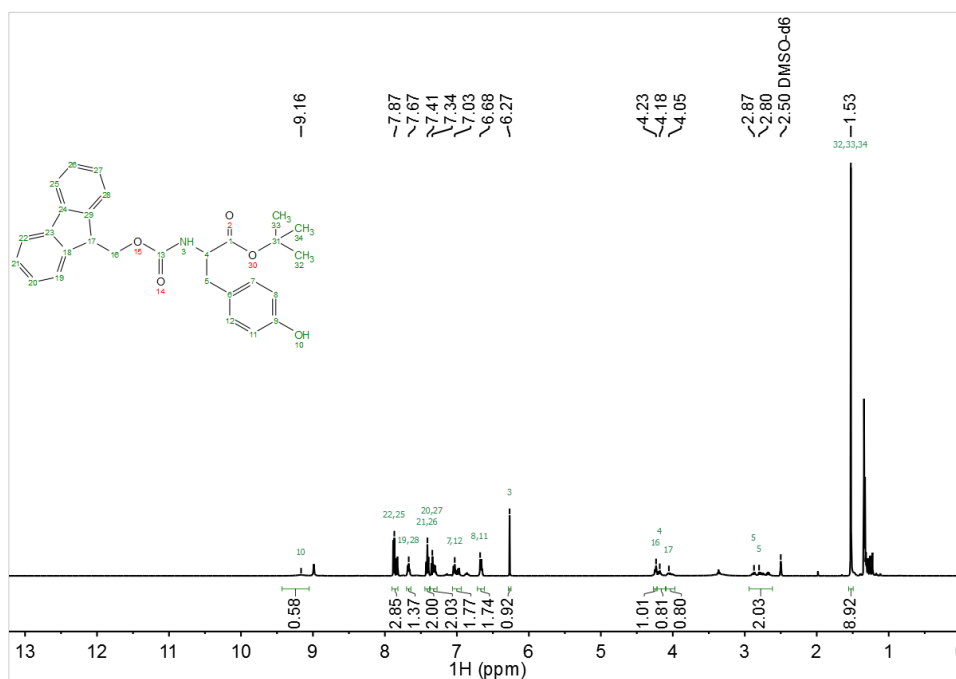


Abbildung 12-11: ¹H-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Tyrosin(OH)-O-Butyl 17.

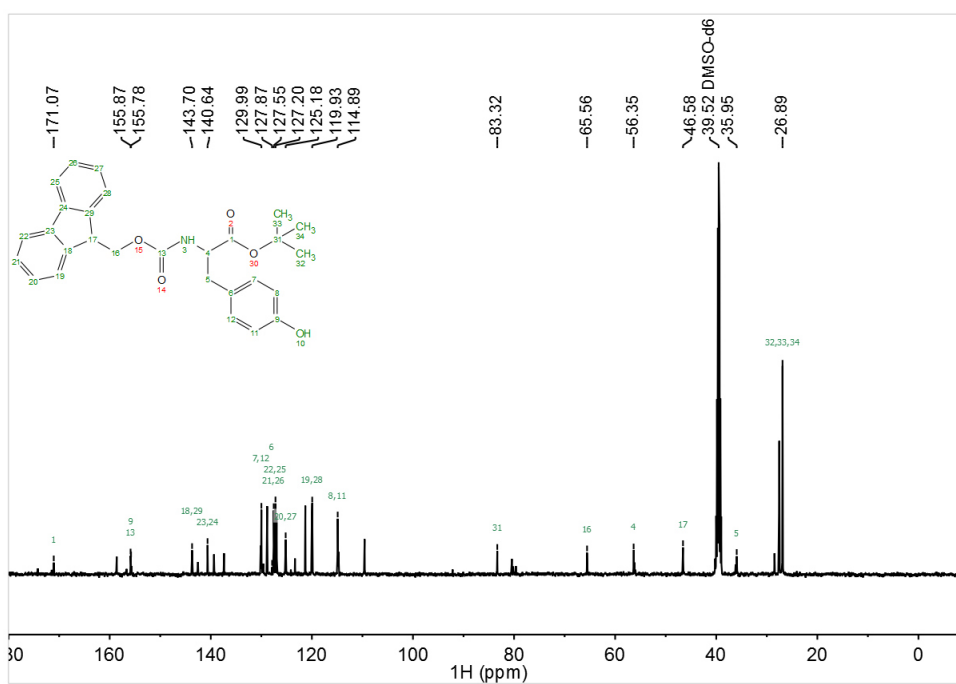


Abbildung 12-12: ¹³C-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Tyrosin(OH)-O-Butyl 17.

12.4. HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-O^tBu 21

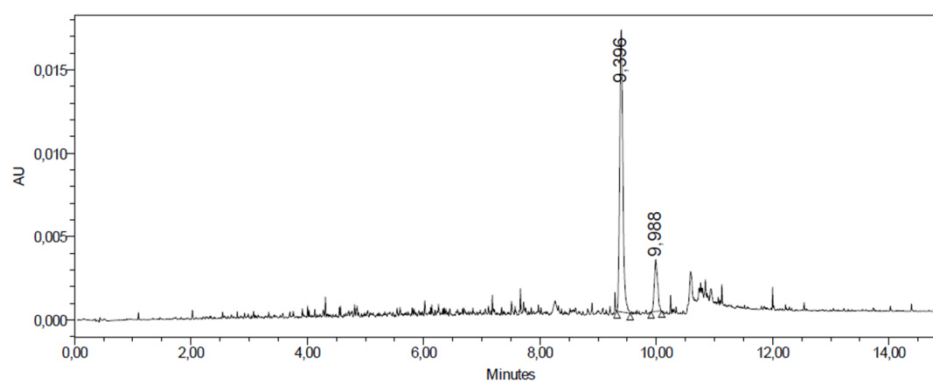


Abbildung 12-13: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-O^tBu 21 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

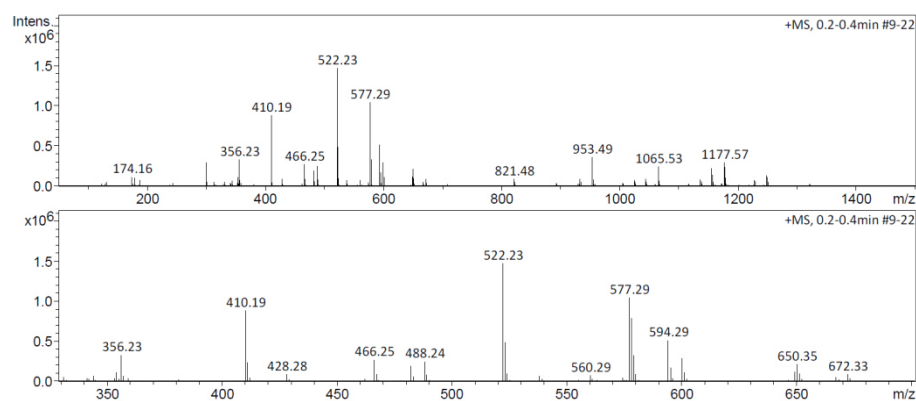


Abbildung 12-14: ESI-MS und Zoom von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-O^tBu 21.

12.5. HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Ser(O-PROXYL)-O^tBu 22

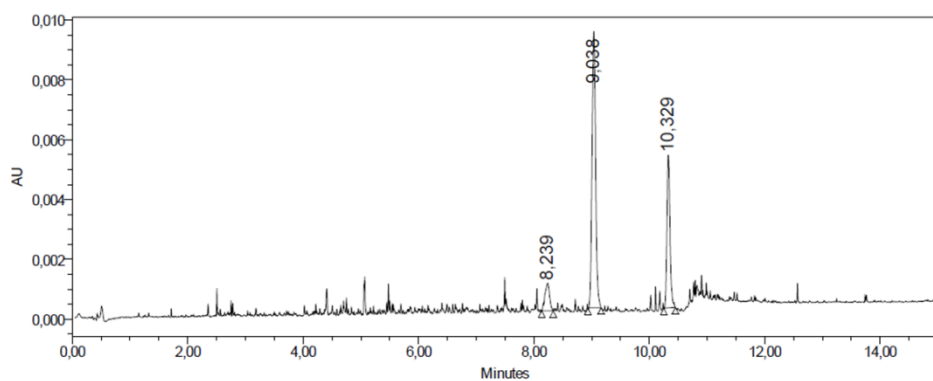


Abbildung 12-15: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Ser(O-PROXYL)-O^tBu 22 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

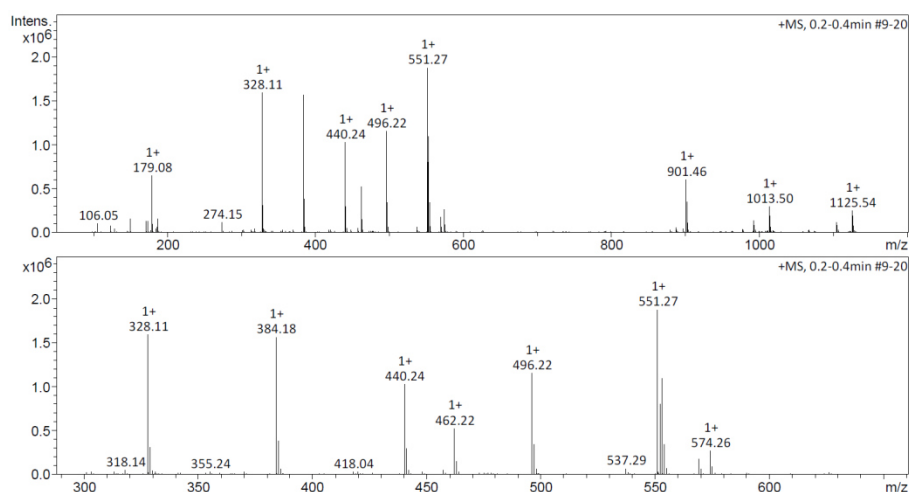


Abbildung 12-16: ESI-MS und Zoom von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-O'Bu 22.

12.6. HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PROXYL)-O'Bu 23

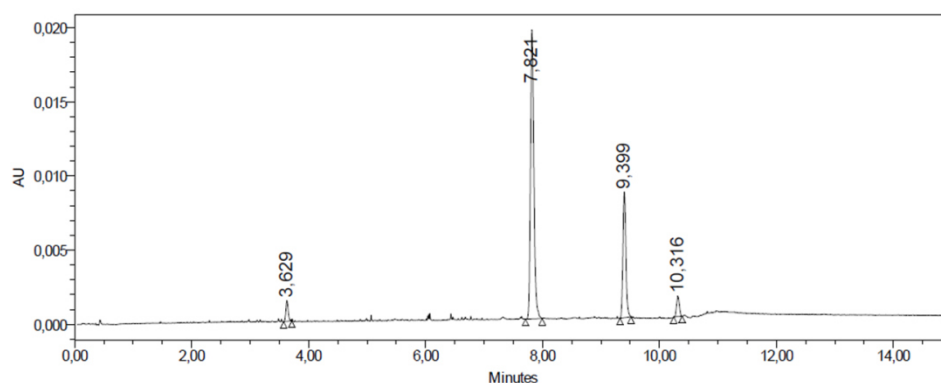


Abbildung 12-17: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PROXYL)-O'Bu 23 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

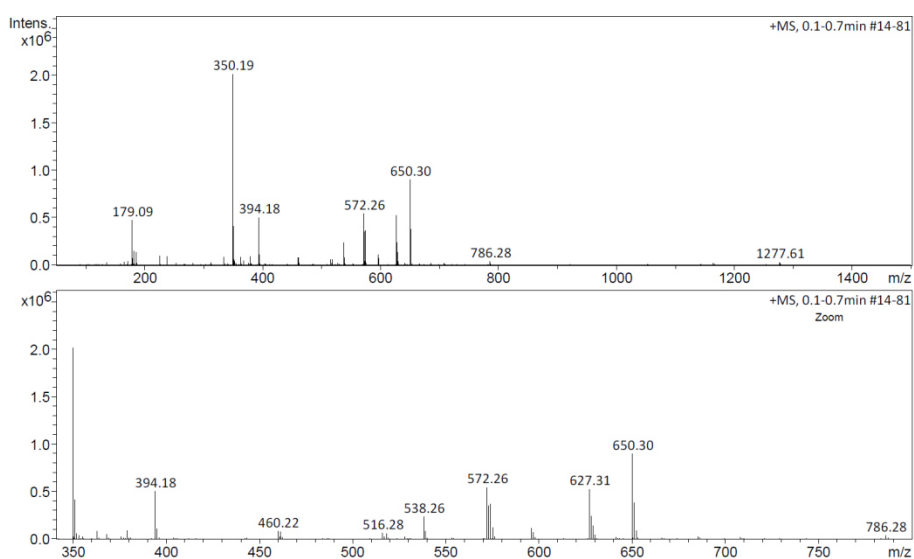


Abbildung 12-18: ESI-MS und Zoom von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PROXYL)-O'Bu 23.

12.7. HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PRX)-OH 23

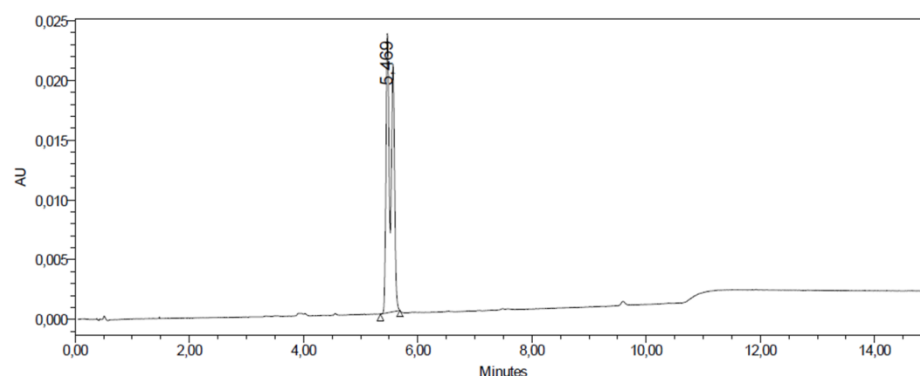


Abbildung 12-19: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PRX)-OH 23 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

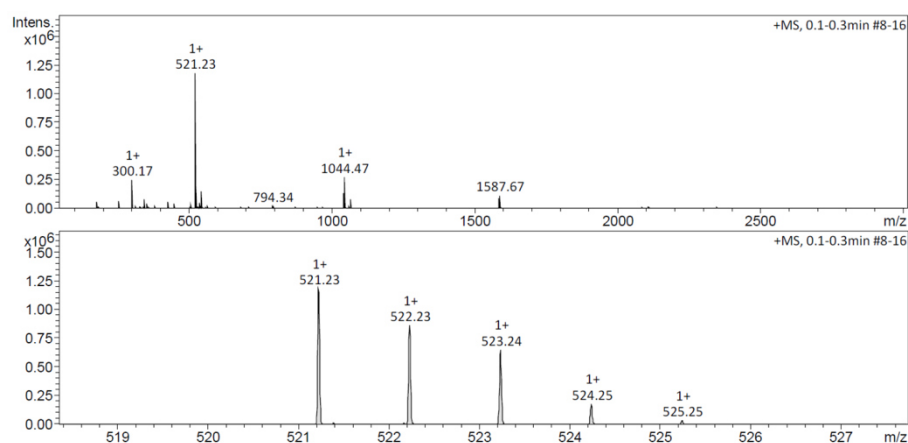


Abbildung 12-20: ESI-MS und Zoom von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PRX)-OH 23.

12.8. HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Ser(O-PRX)-OH 25

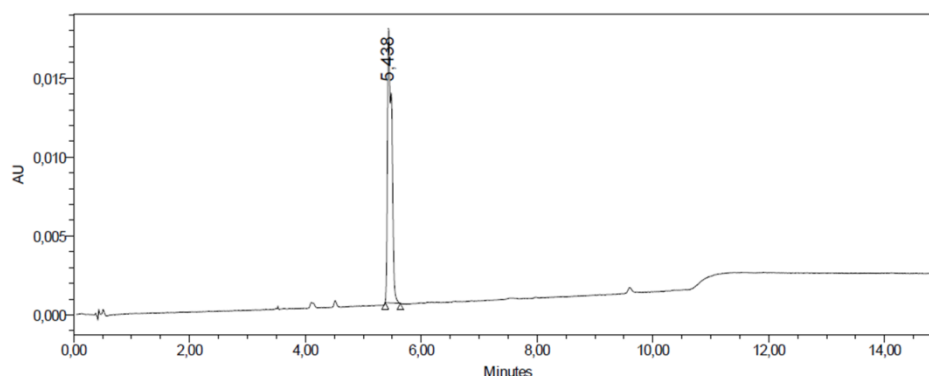


Abbildung 12-21: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Ser(O-PRX)-OH 25 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

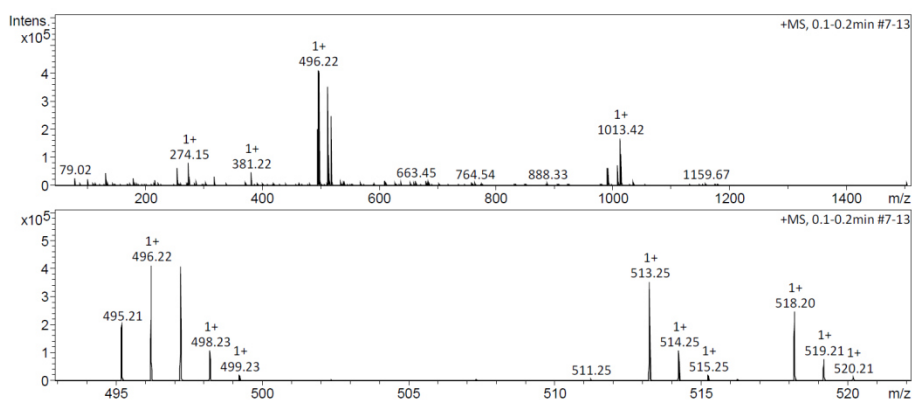


Abbildung 12-22: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Ser(O-PRX)-OH 25.

12.9. HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PRX)-OH 26

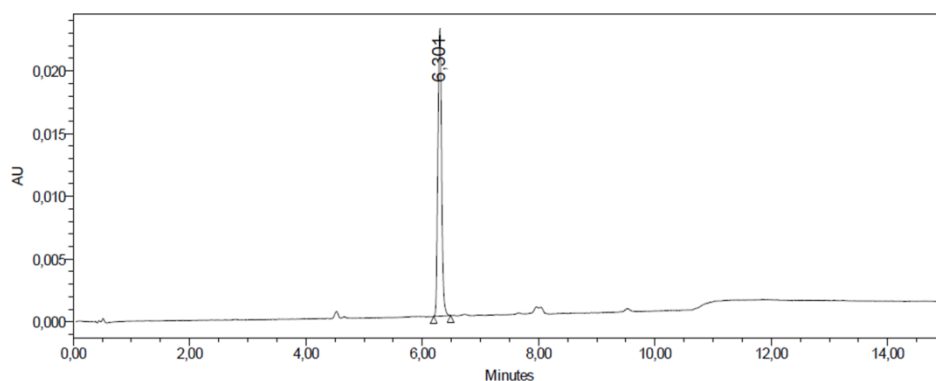


Abbildung 12-23: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PRX)-OH 26 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

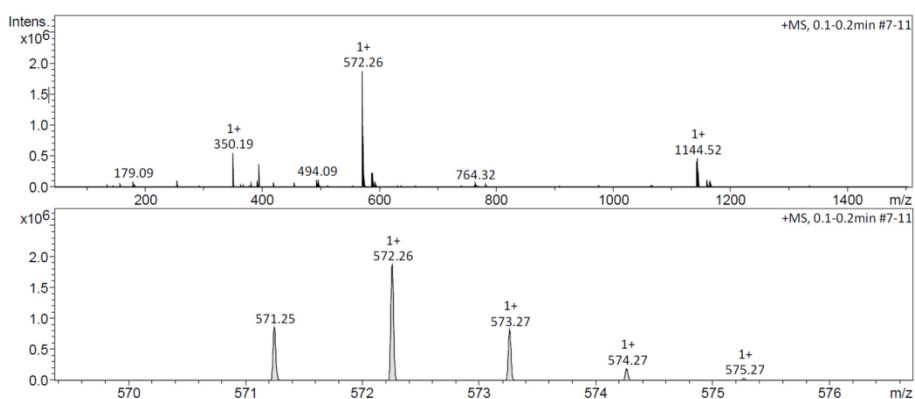


Abbildung 12-24: ESI-MS-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PRX)-OH 26.

12.10. HPLC- und MS-Daten von HO-TOTAPOL-*N*-Boc 29

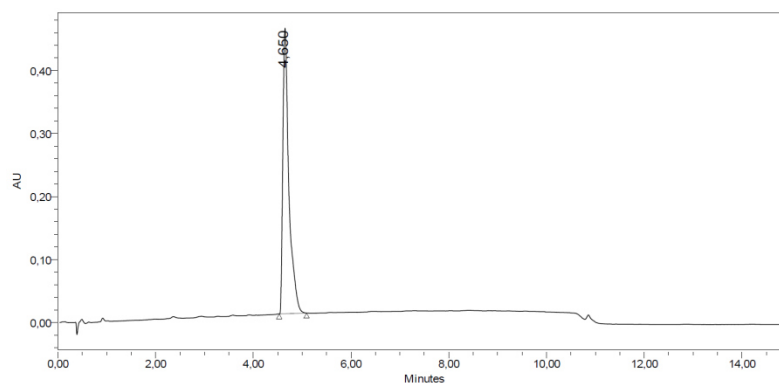


Abbildung 12-25: HPLC-Chromatogramm von HO-TOTAPOL-*N*-Boc 29 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

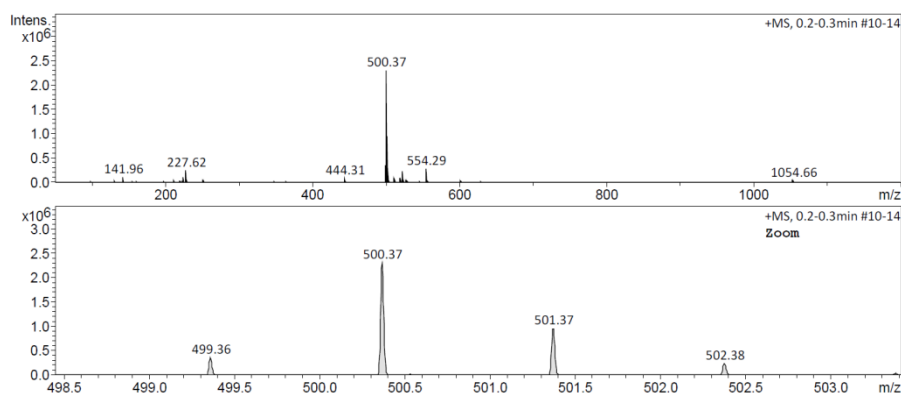


Abbildung 12-26: ESI-MS von HO-TOTAPOL-*N*-Boc 29.

12.11. HPLC- und MS-Daten von Fmoc-*N**H*-L-Glu(*O*-Totapol-*N*-Boc)-O^tBu 32

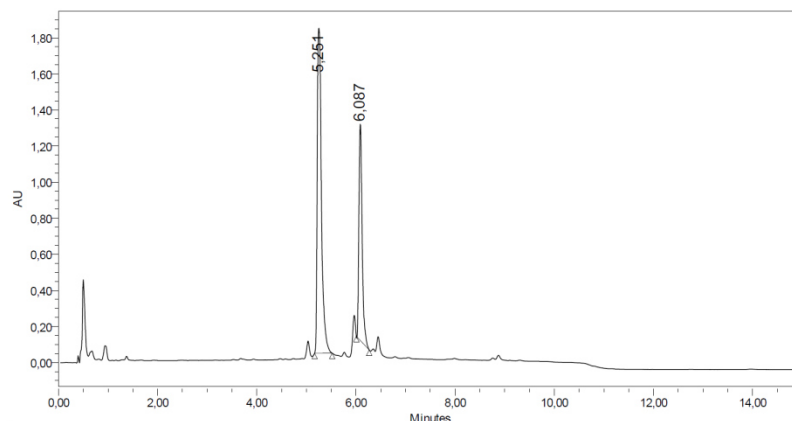


Abbildung 12-27: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-*N**H*-L-Glu(*O*-Totapol-*N*-Boc)-O^tBu 32 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

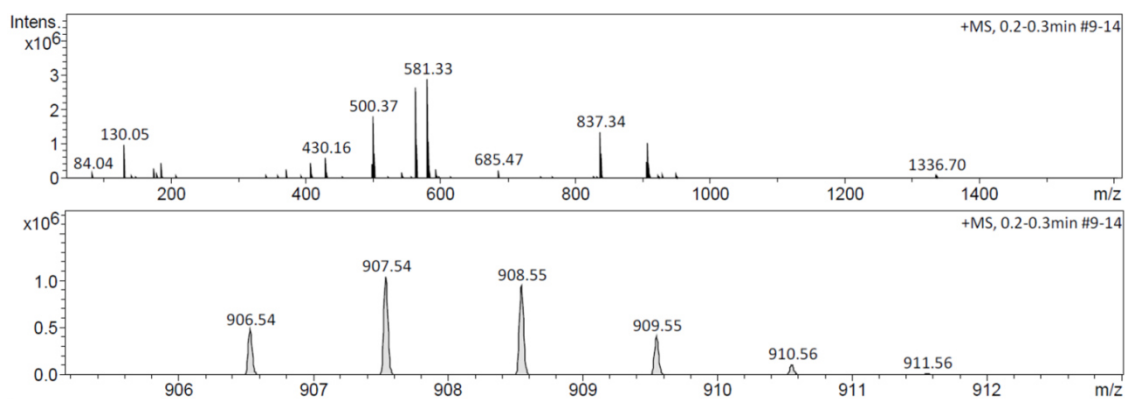


Abbildung 12-28: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL-N-Boc)-O^tBu 32.

12.12. MS-Daten von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL)-OH 72

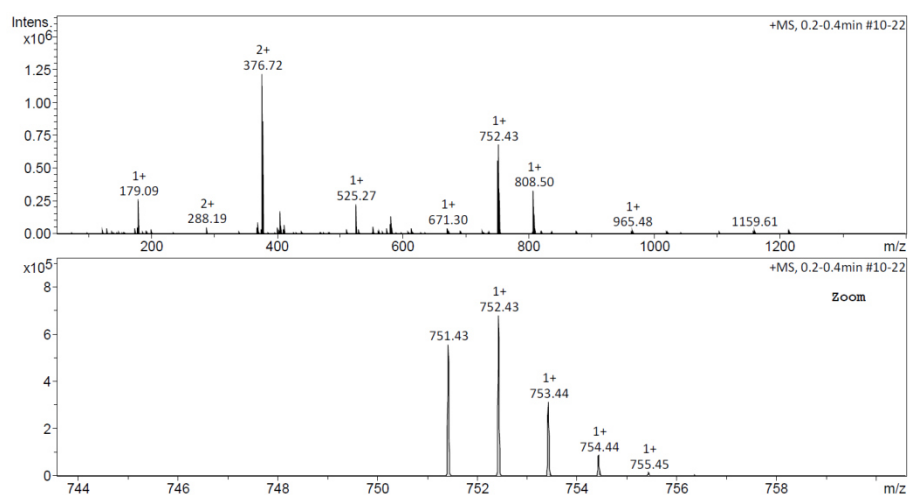


Abbildung 12-29: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL)-OH 72.

12.13. HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL-N-Boc)-OH 33

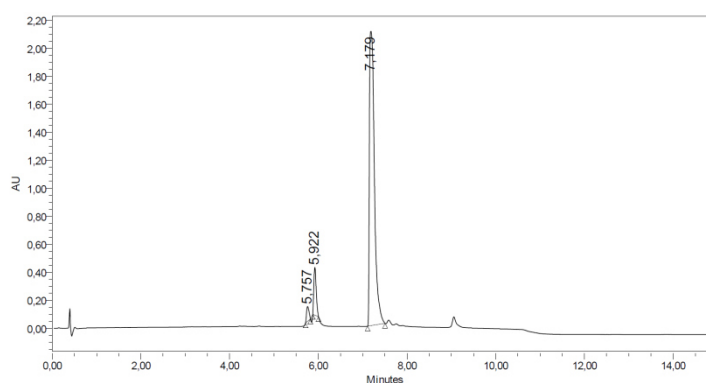


Abbildung 12-30: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL-N-Boc)-OH 33 bei 214 nm.

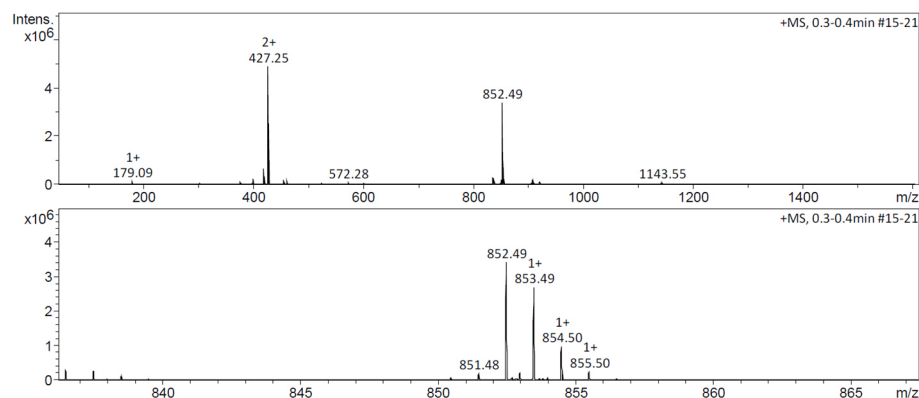


Abbildung 12-31: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL-N-Boc)-OH **33**.

12.14. HPLC- und MS-Daten von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-O^tBu **35**

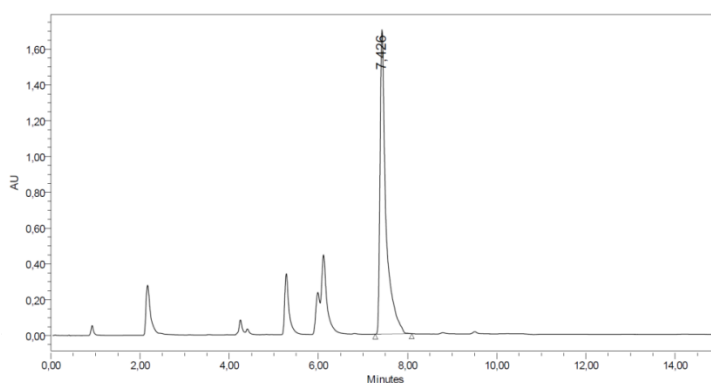


Abbildung 12-32: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-O^tBu **35** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

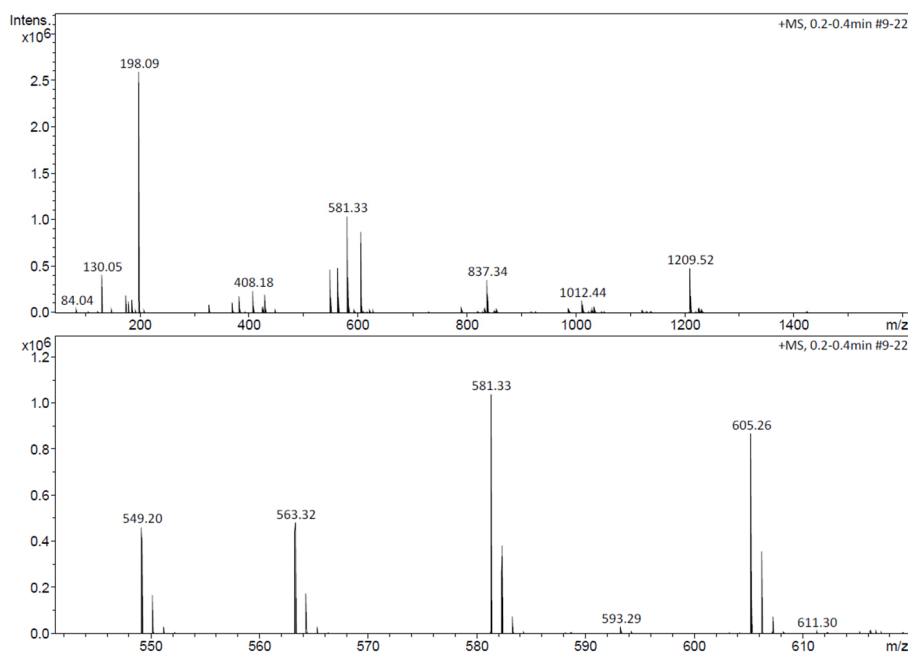


Abbildung 12-33: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-O^tBu **35**.

12.15. HPLC-, MS- und NMR-Daten von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH **36**

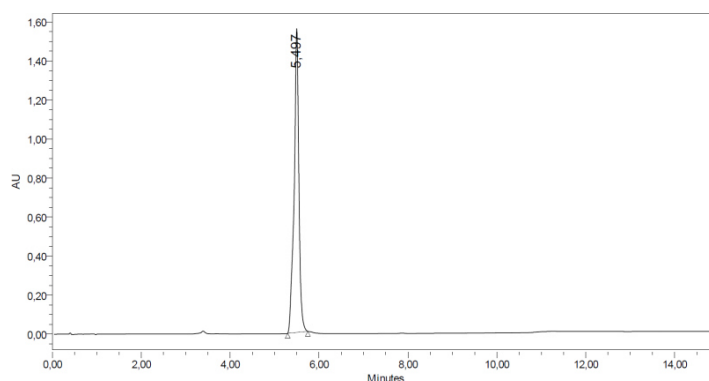


Abbildung 12-34: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH **36** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

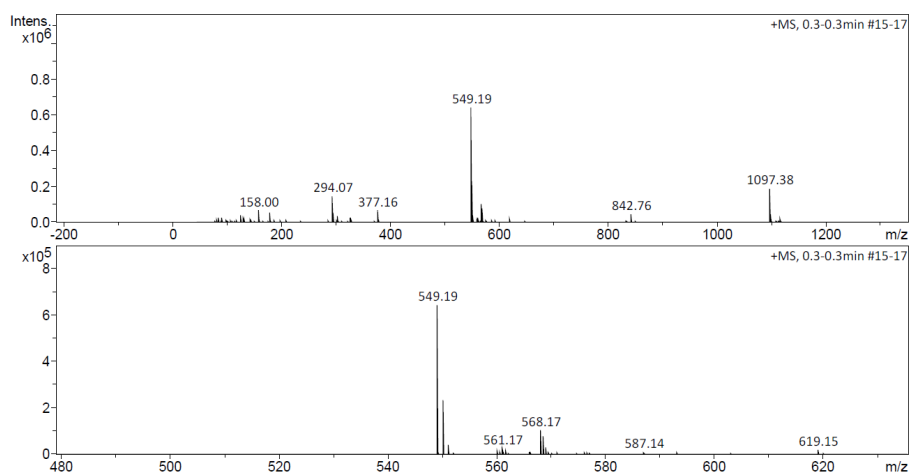


Abbildung 12-35: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH **36**.

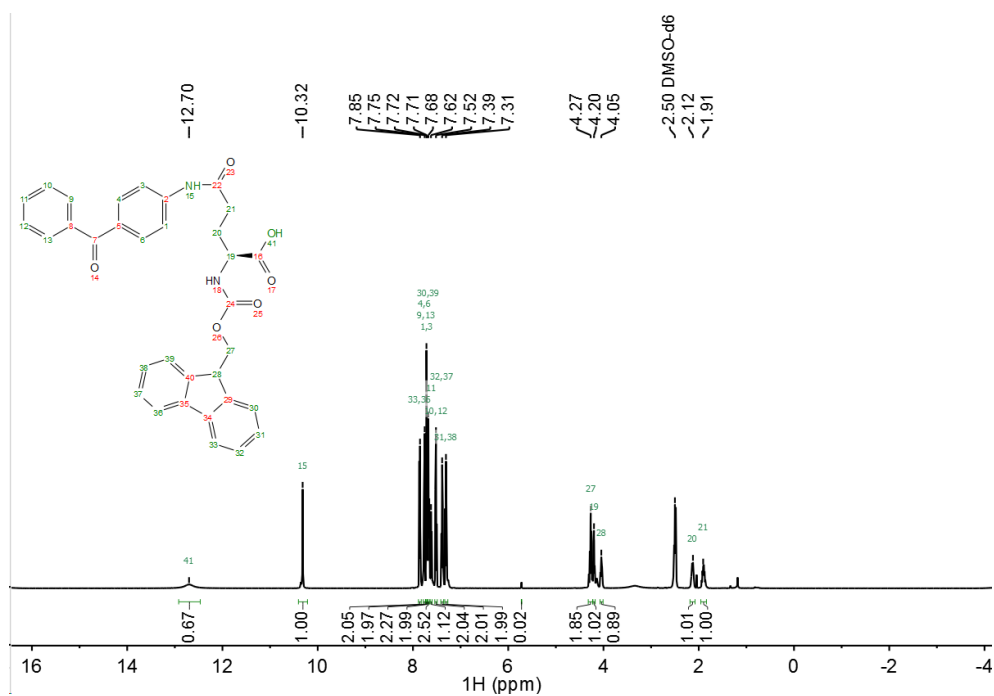


Abbildung 12-36: ¹H-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenone)-OH 36.

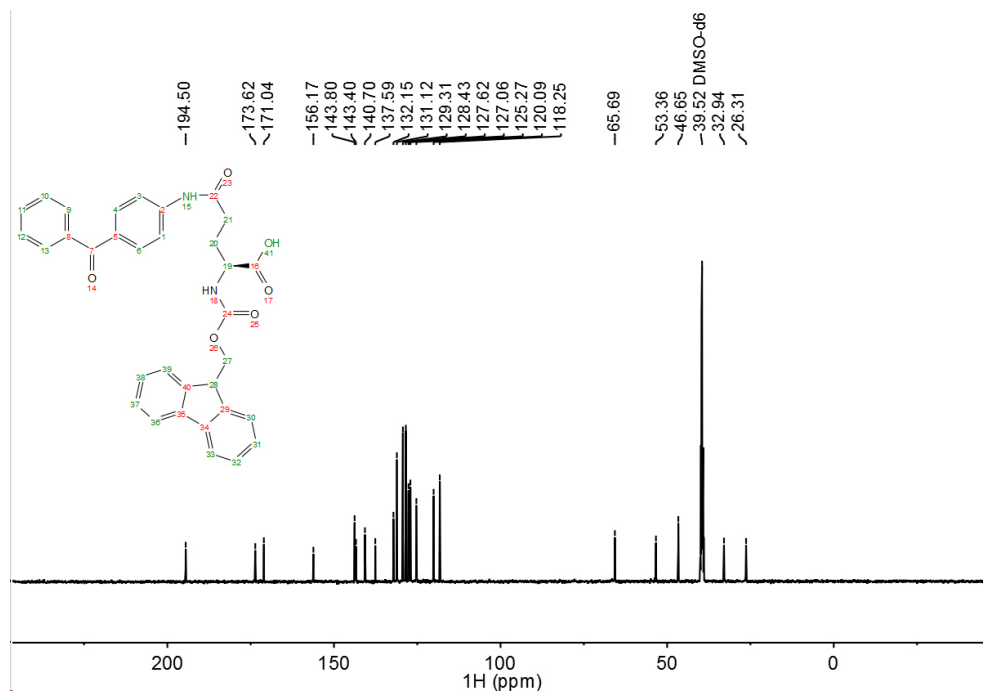


Abbildung 12-37: ¹³C-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenone)-OH 36.

12.16. HPLC- und MS-Daten von HN-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 71

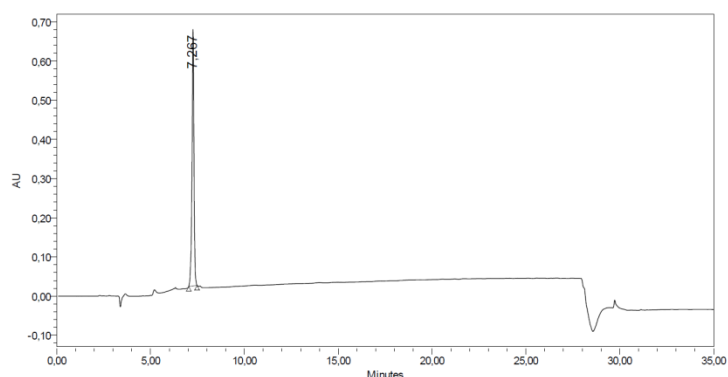


Abbildung 12-38: HPLC-Chromatogramm von HN-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly **71** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

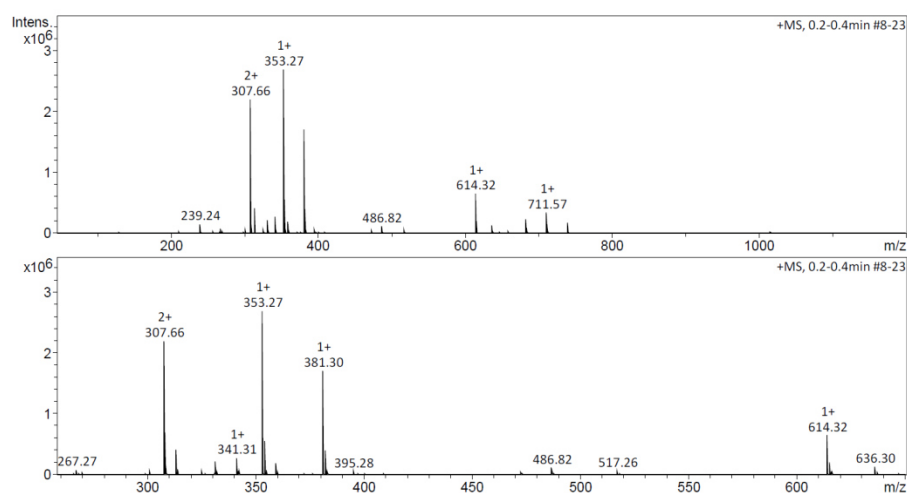


Abbildung 12-39: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von HN-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly **71**.

12.17. HPLC- und MS-Daten von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 37

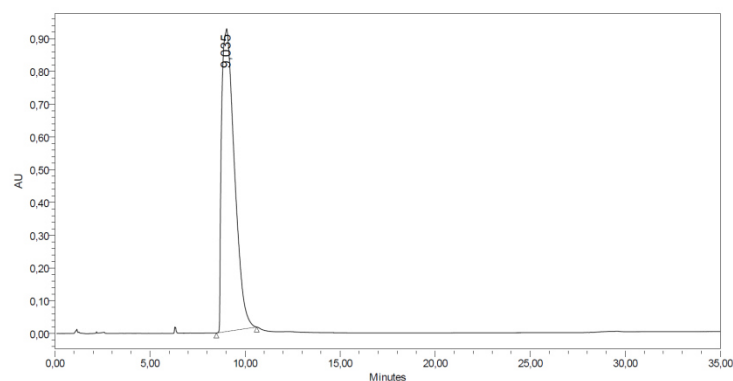


Abbildung 12-40: HPLC-Chromatogramm von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly **37** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

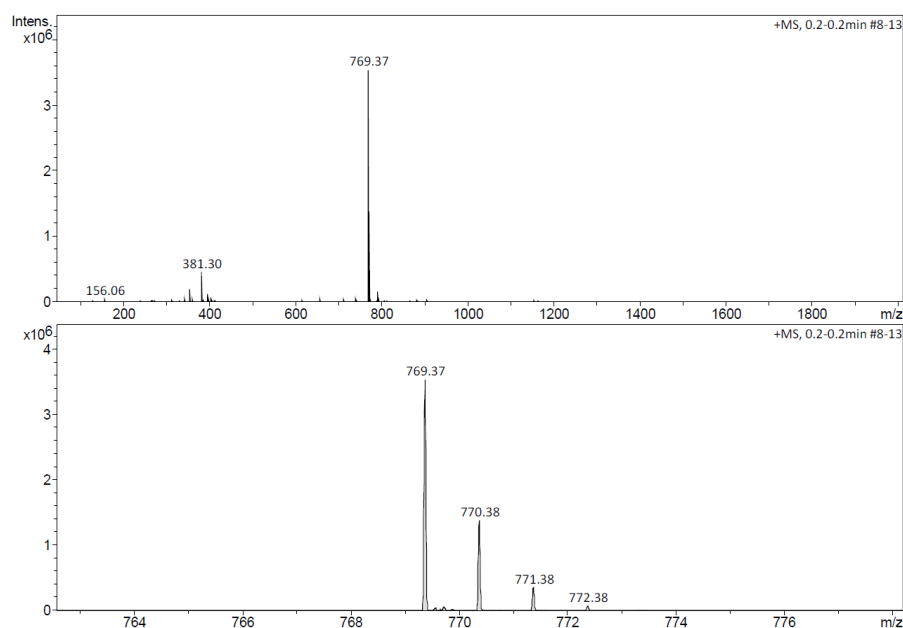


Abbildung 12-41: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 37.

12.18. HPLC- und MS-Daten von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 38

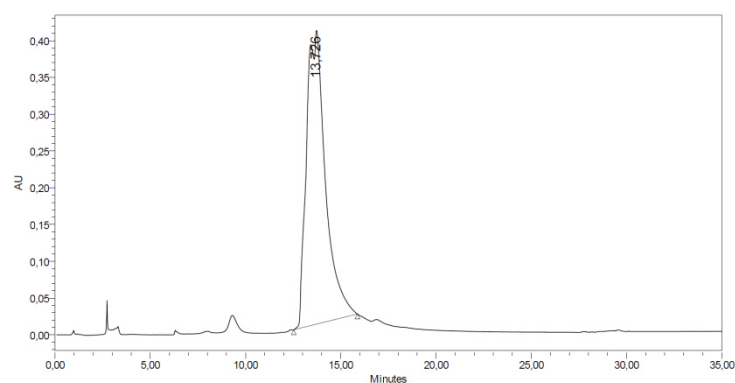


Abbildung 12-42: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 38 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

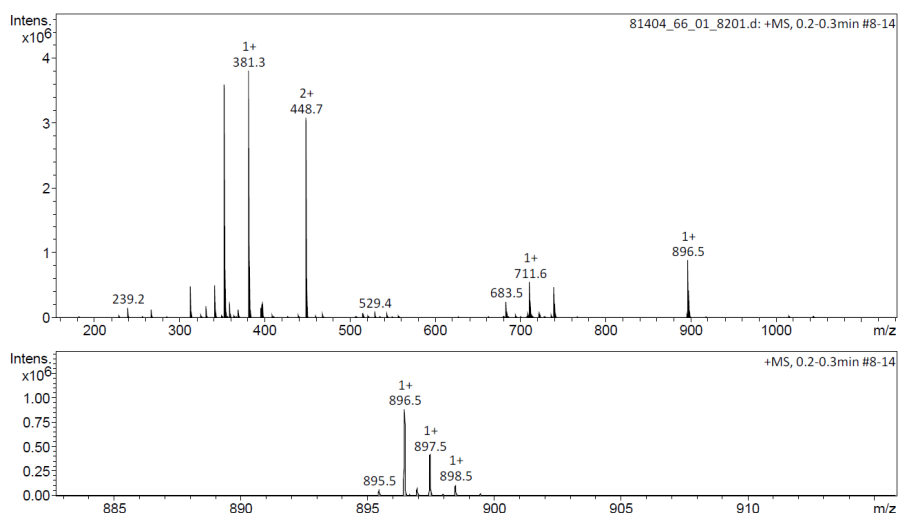


Abbildung 12-43: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 38.

12.19. HPLC- und MS-Daten von Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 39

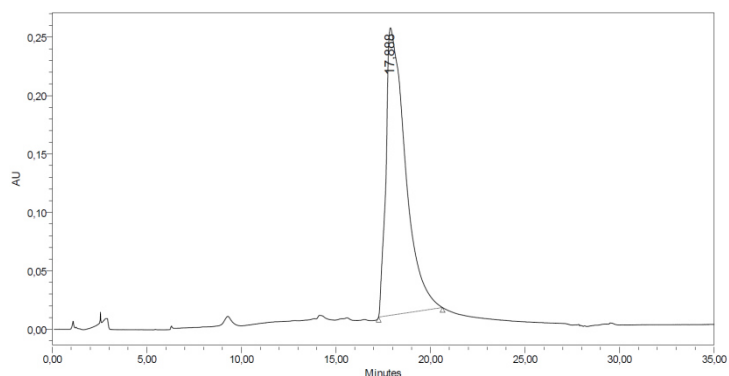


Abbildung 12-44: HPLC-Chromatogramm von Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 39 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

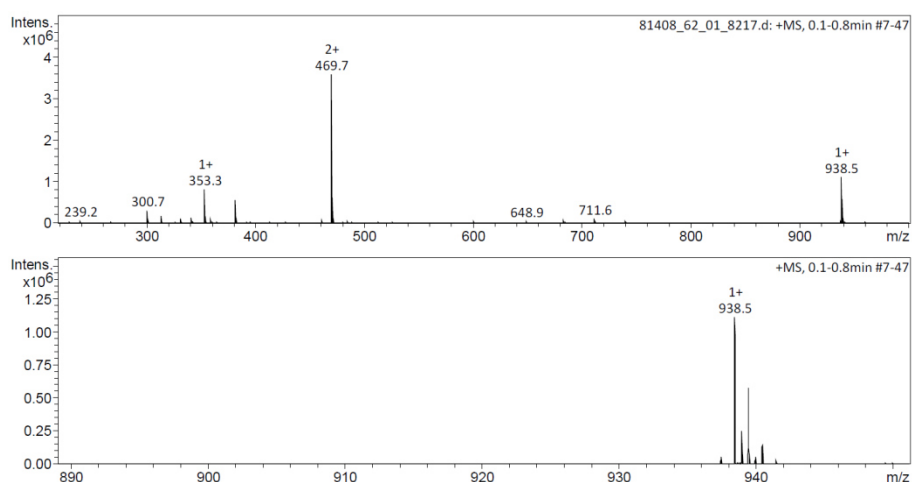


Abbildung 12-45: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 39.

12.20. HPLC- und MS-Daten von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 40

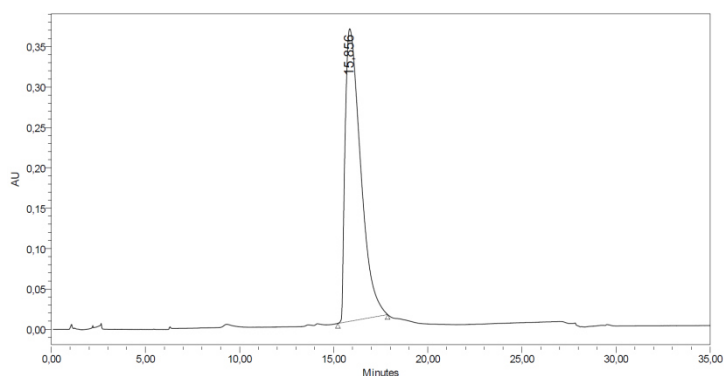


Abbildung 12-46: HPLC-Chromatogramm von Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 40 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

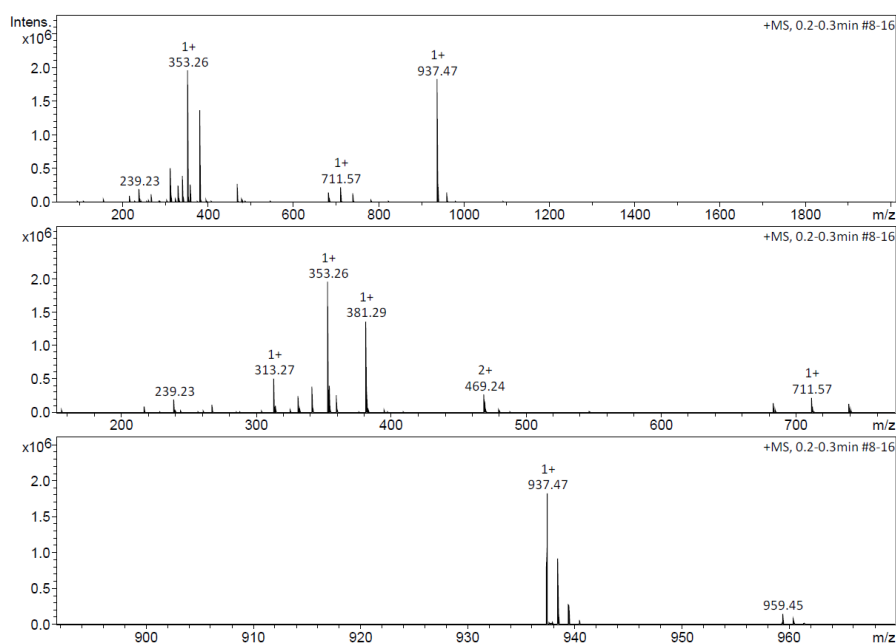


Abbildung 12-47: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 40.

12.21. HPLC- und MS-Daten von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 41

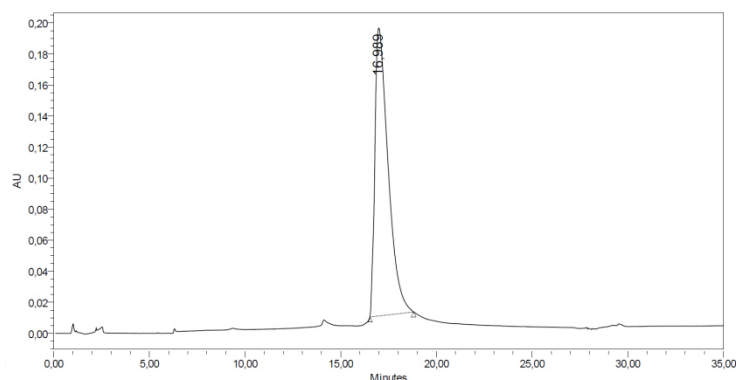


Abbildung 12-48: HPLC-Chromatogramm von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly **41** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

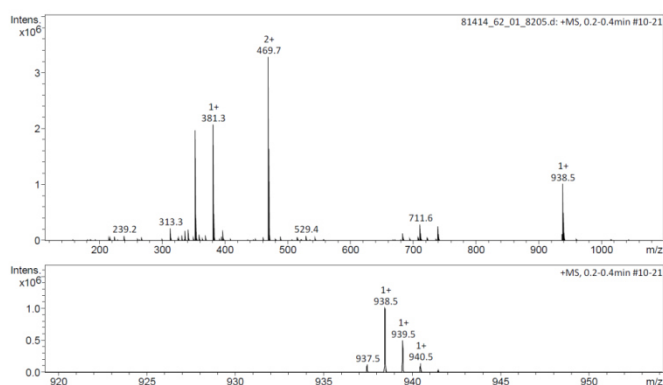


Abbildung 12-49: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly **41**.

12.22. HPLC- und MS-Daten von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42

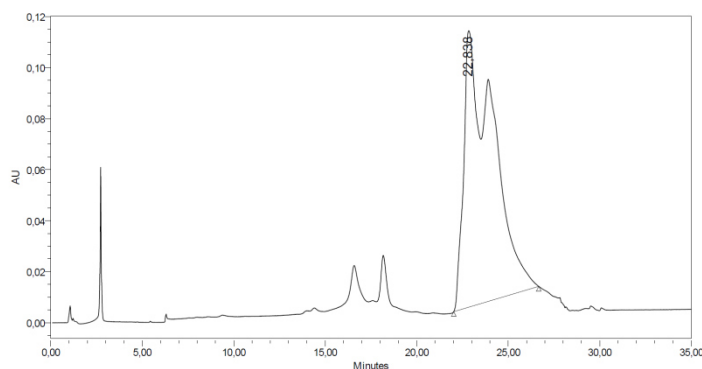


Abbildung 12-50: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly **42** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

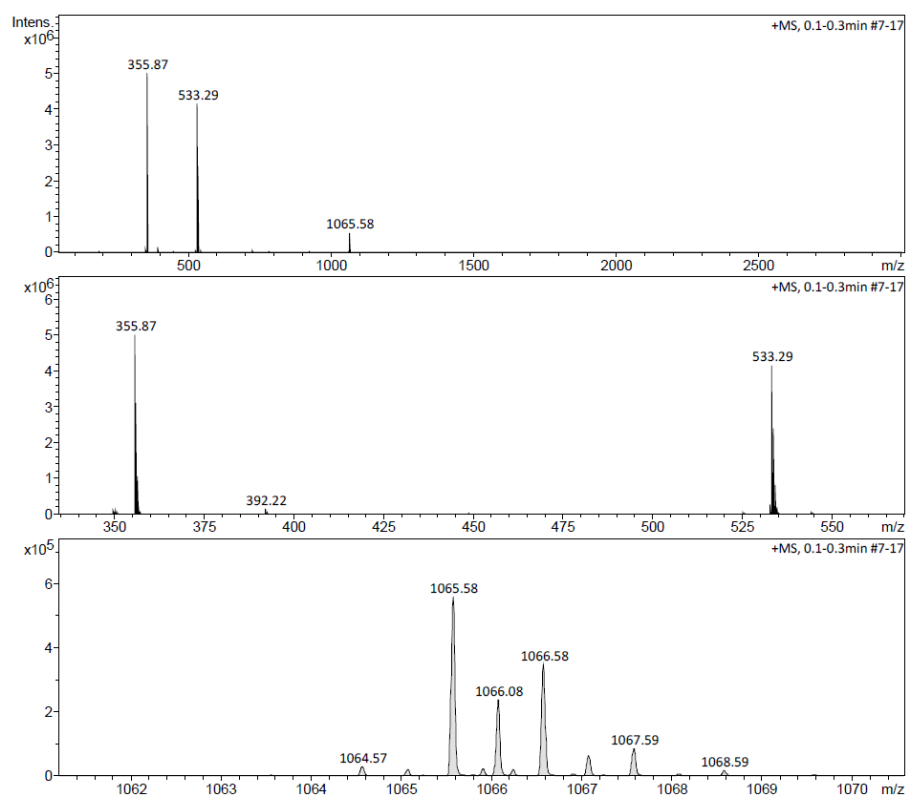


Abbildung 12-51: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly **42**.

12.23. HPLC- und MS-Daten von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly **43**

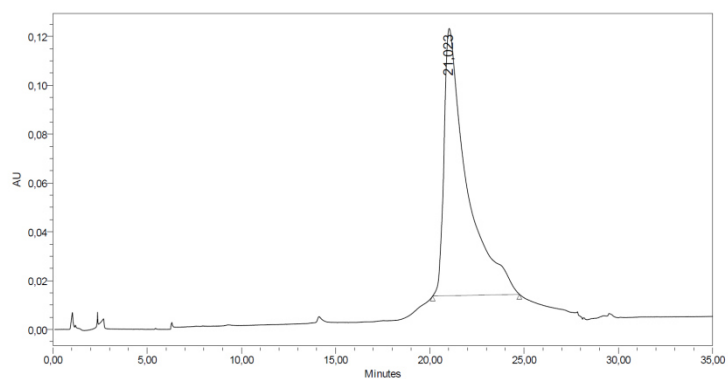


Abbildung 12-52: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly **43** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

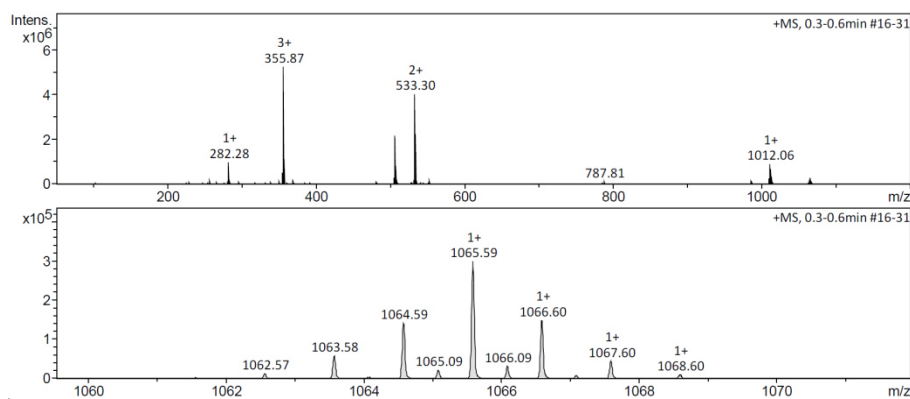


Abbildung 12-53: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 43.

12.24. HPLC- und MS-Daten von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44

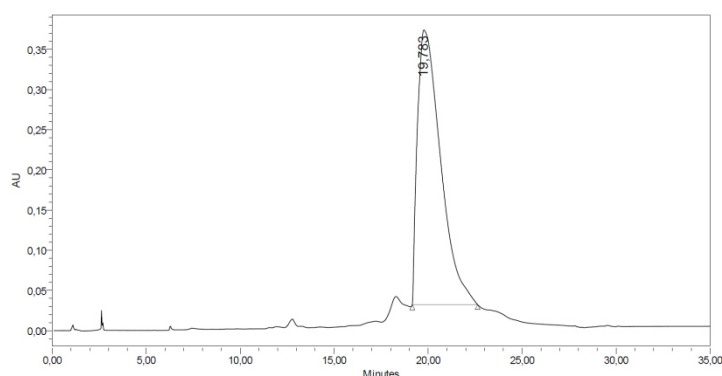


Abbildung 12-54: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

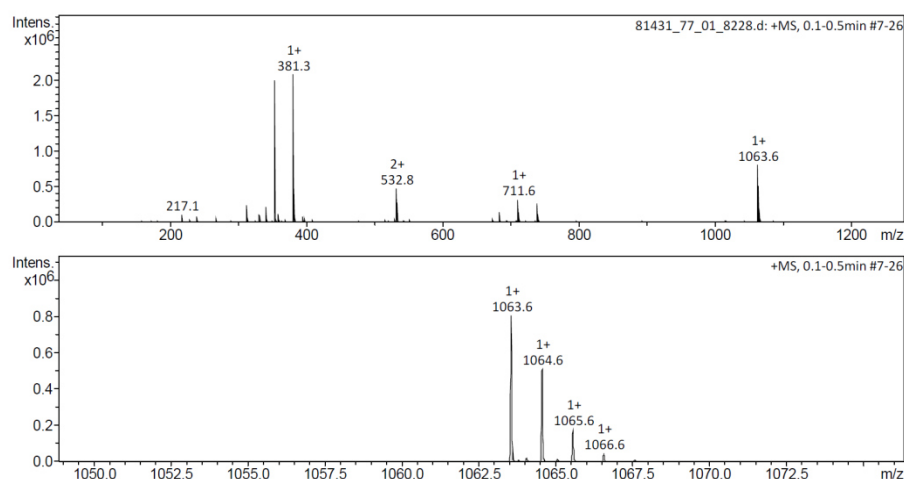


Abbildung 12-55: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44.

12.25. HPLC- und MS-Daten der Reproduktion von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42

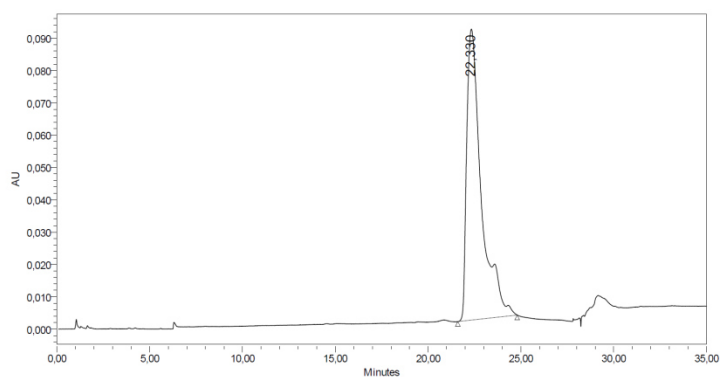


Abbildung 12-56: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

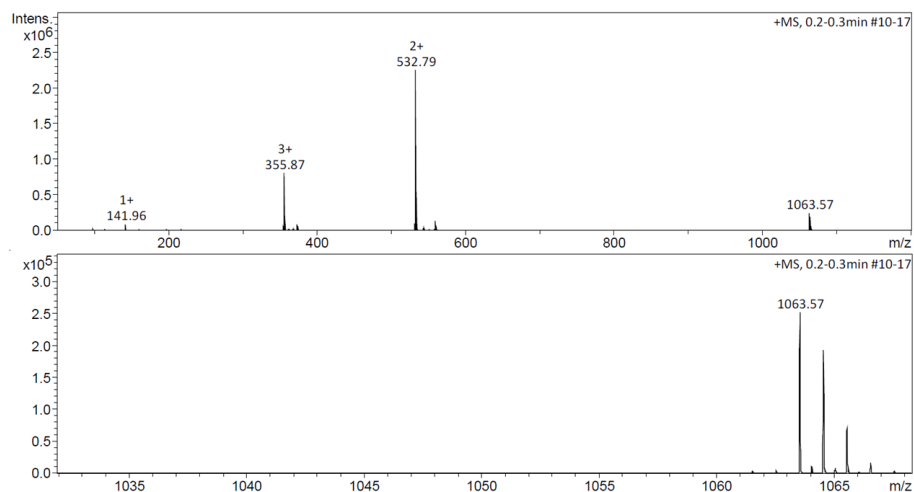


Abbildung 12-57: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42.

12.26. HPLC- und MS-Daten der Reproduktion von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 43

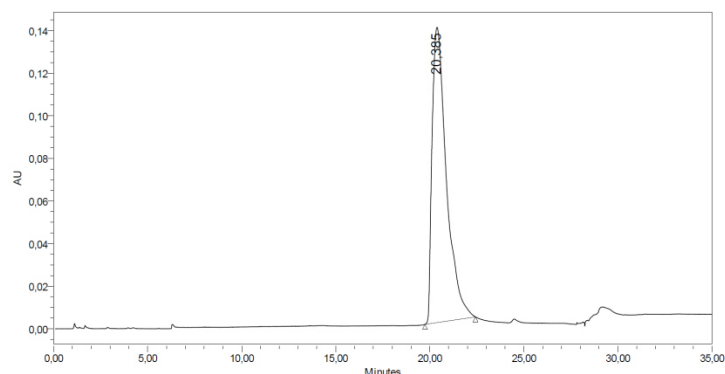


Abbildung 12-58: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly **43** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

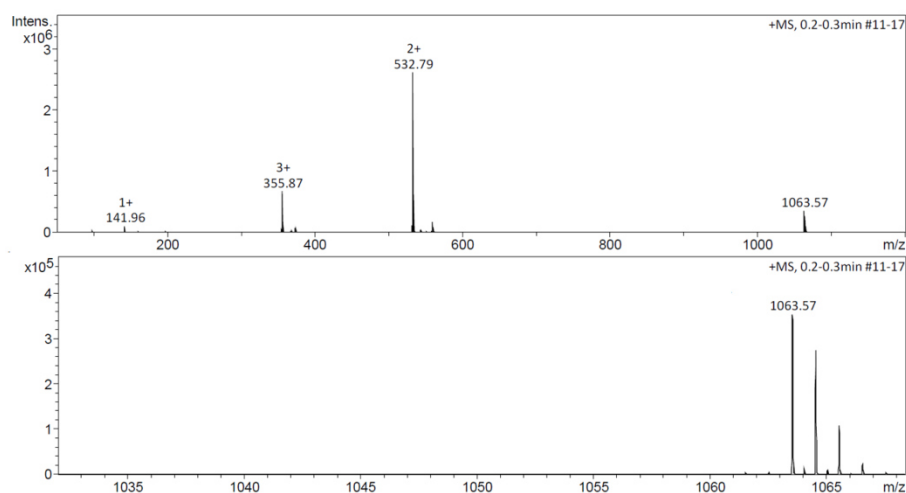


Abbildung 12-59: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly **43**.

12.27. HPLC- und MS-Daten der Reproduktion von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44

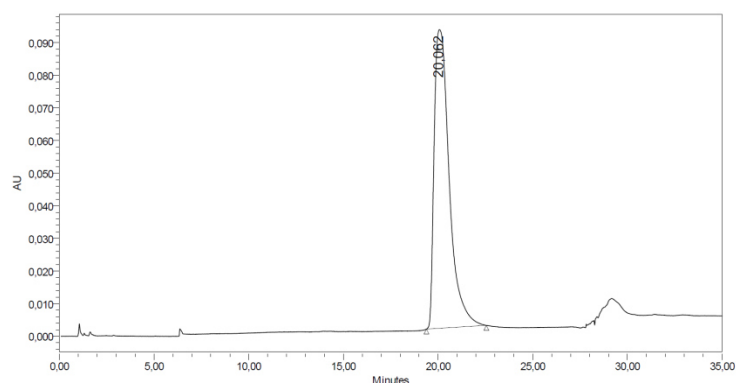


Abbildung 12-60: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly **44** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

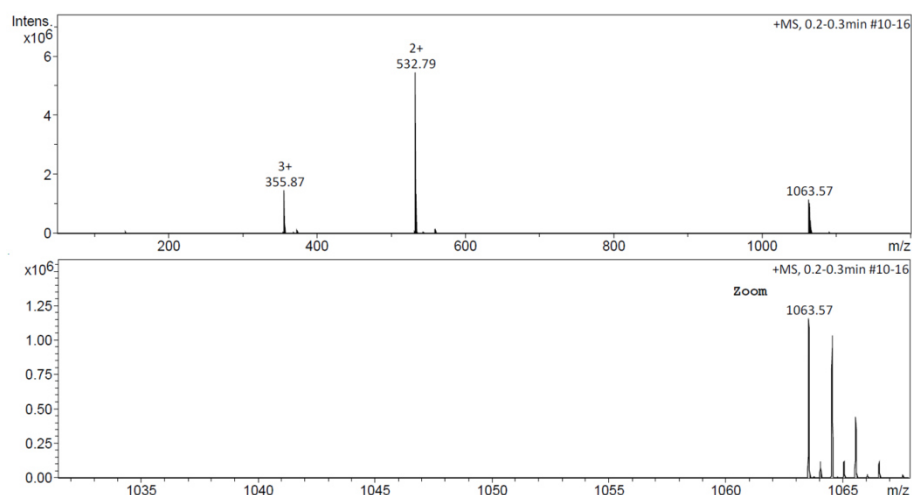


Abbildung 12-61: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44.

12.28. HPLC- und MS-Daten von NH-His-Glu(Benzopenon)-Tyr-Gly-OH 45

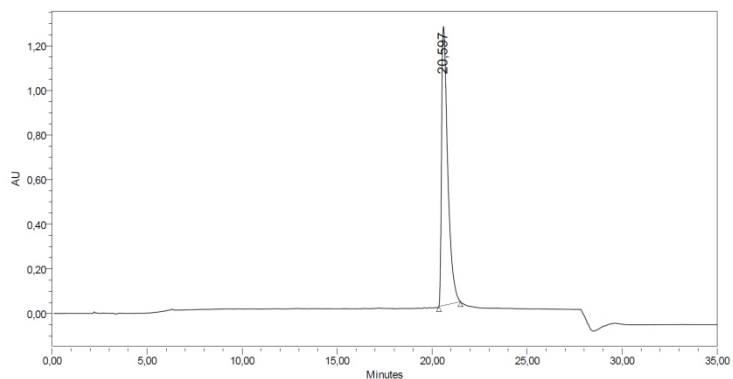


Abbildung 12-62: HPLC-Chromatogramm von NH-His-Glu(Benzopenon)-Tyr-Gly-OH 45 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

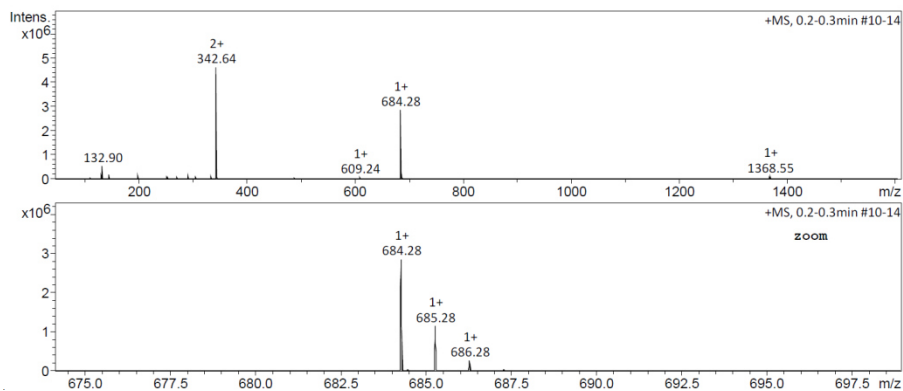


Abbildung 12-63: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von NH-His-Glu(Benzopenon)-Tyr-Gly-OH 45.

12.29. HPLC- und MS-Daten von NH-His-Glu-Tyr-Gly-OH **46**

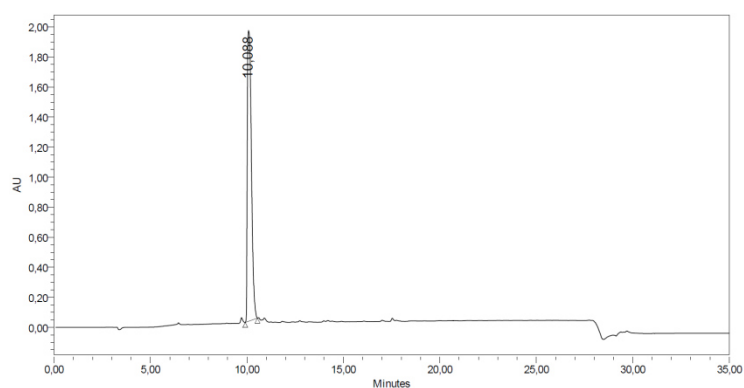


Abbildung 12-64: HPLC-Chromatogramm von NH-His-Glu-Tyr-Gly-OH **46** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

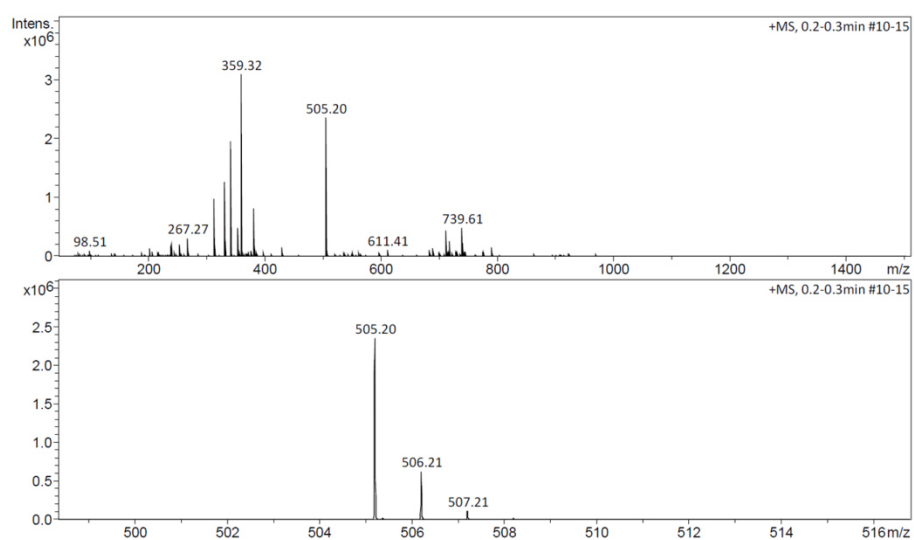


Abbildung 12-65: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von NH-His-Glu-Tyr-Gly-OH **46**.

12.30. MS- und NMR-Daten von 3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 51

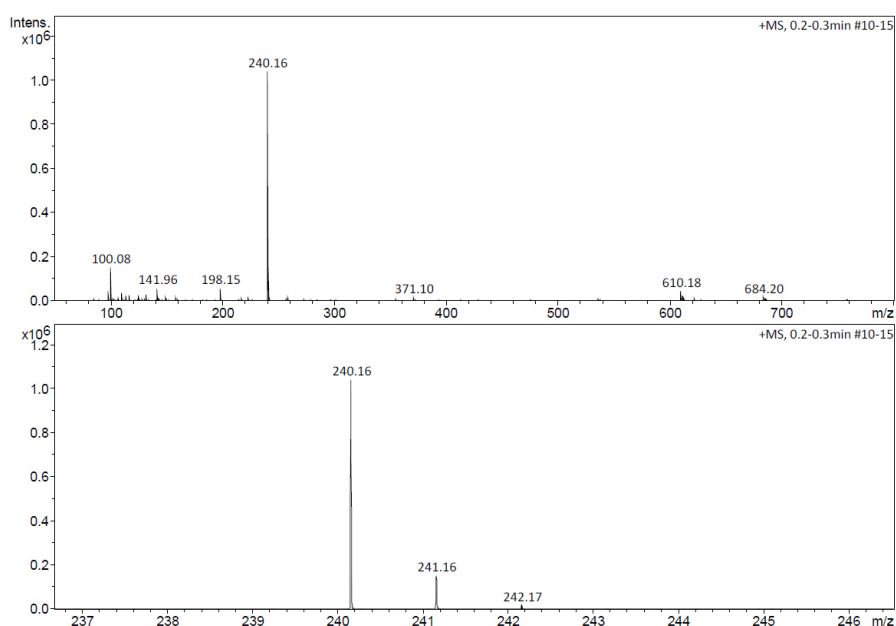


Abbildung 12-66: ESI-MS von 3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 51.

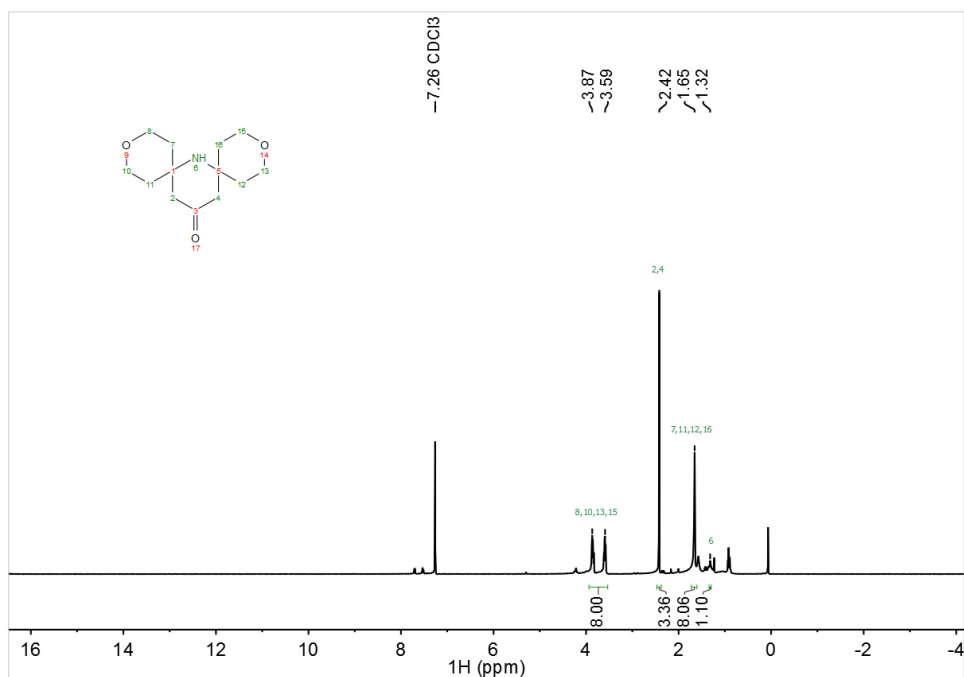


Abbildung 12-67: ¹H-NMR-Spektrum von 3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 51.

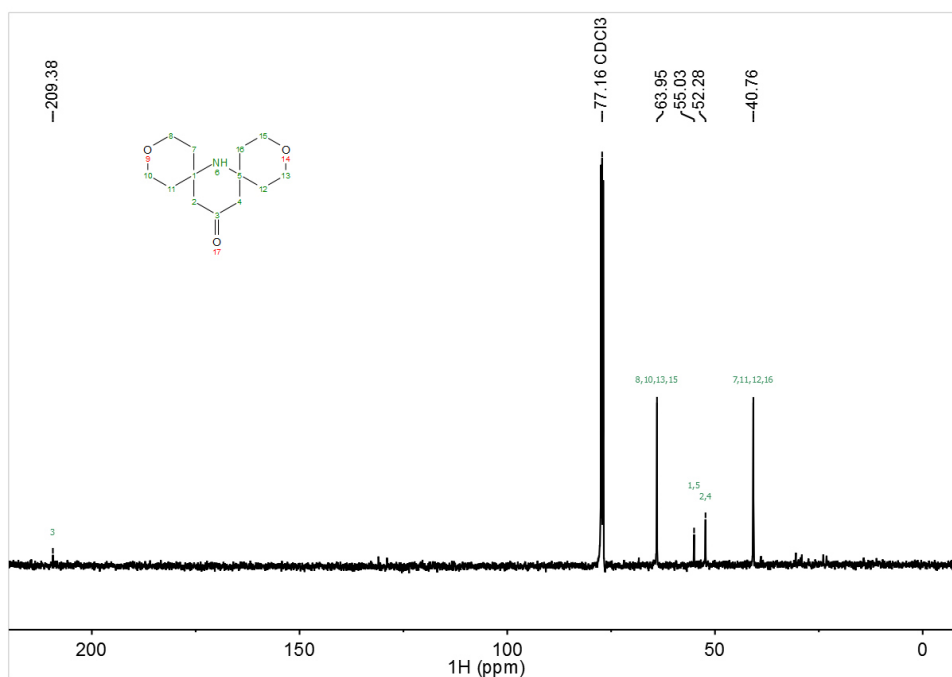


Abbildung 12-68: ^{13}C -NMR-Spektrum von 3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 51.

12.31. MS-Daten von 7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 52

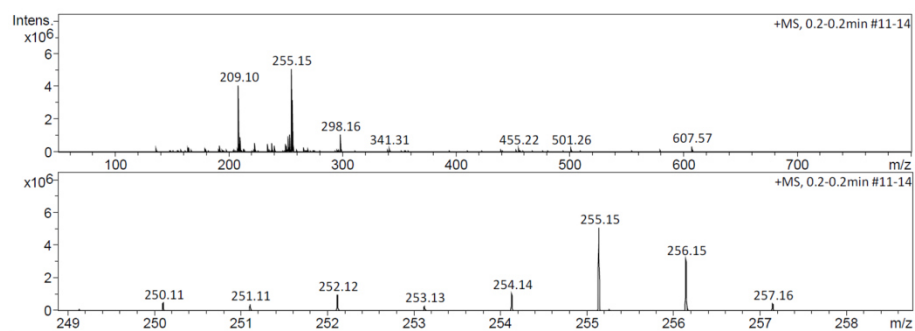


Abbildung 12-69: ESI-MS von 7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 52.

12.32. MS- und ESR-Daten von 15-amino-7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan 47

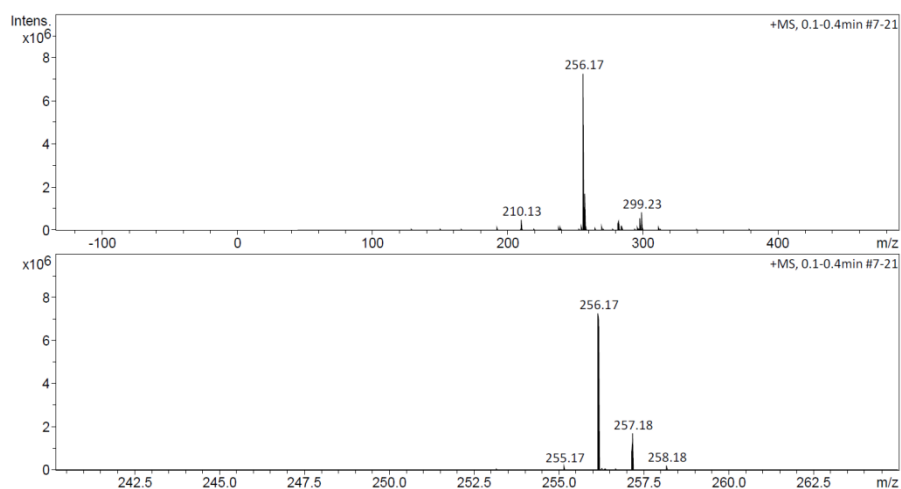


Abbildung 12-70: ESI-MS von 15-amino-7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan 47.

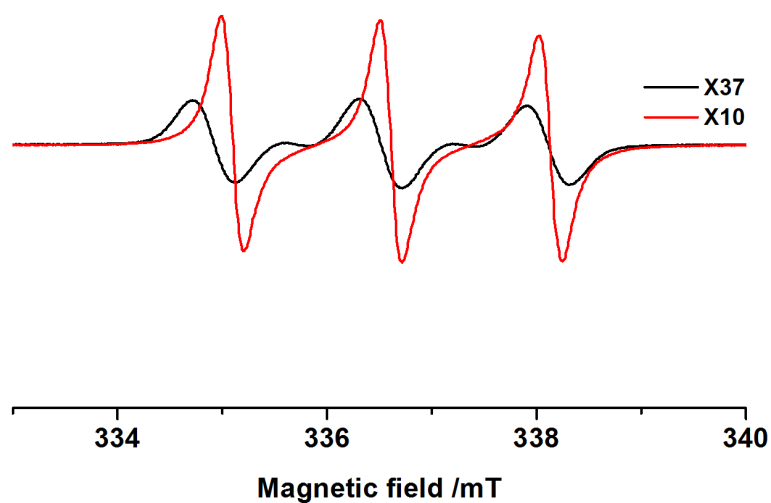


Abbildung 12-71: ESR-Spektrum von 15-amino-7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan 47 und 3-Carboxy-PROXYL 8 bei 298 K in Acetonitril mit einer Konzentration von 15 mM.

12.33. NMR-Daten von Bisthioether 55

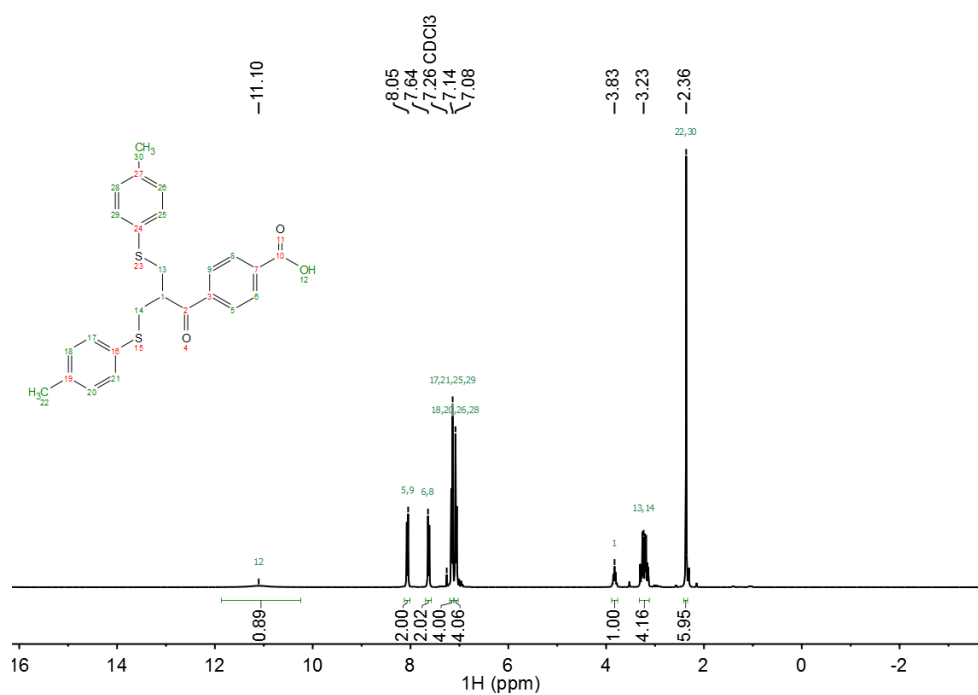


Abbildung 12-72: ¹H-NMR-Spektrum von Bisthioether 55.

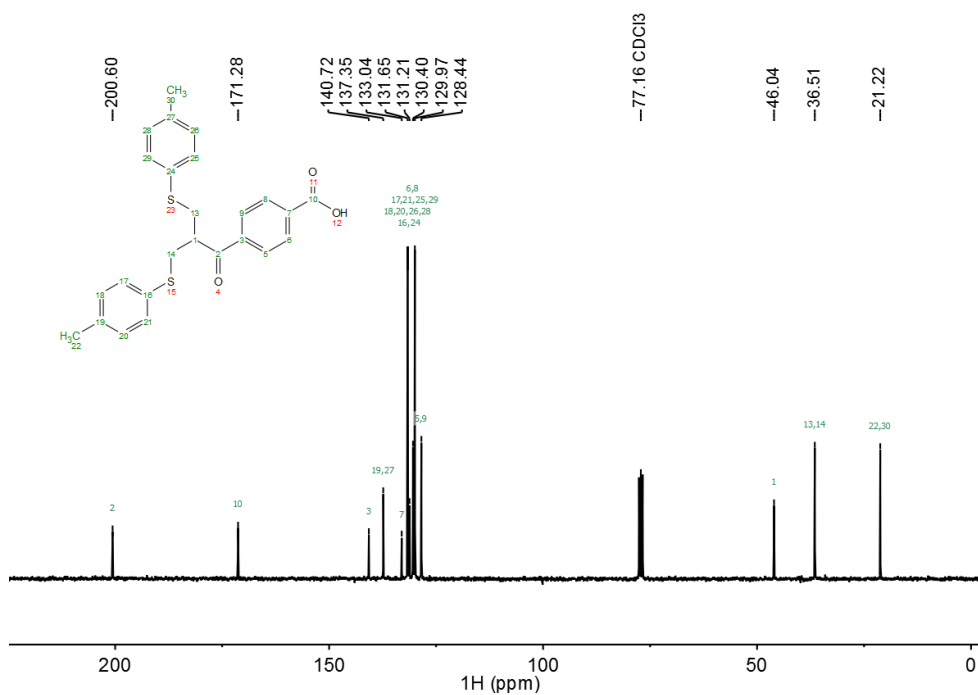


Abbildung 12-73: ¹³C-NMR-Spektrum von Bisthioether 55.

12.34. NMR-Daten von Bissulfon 47

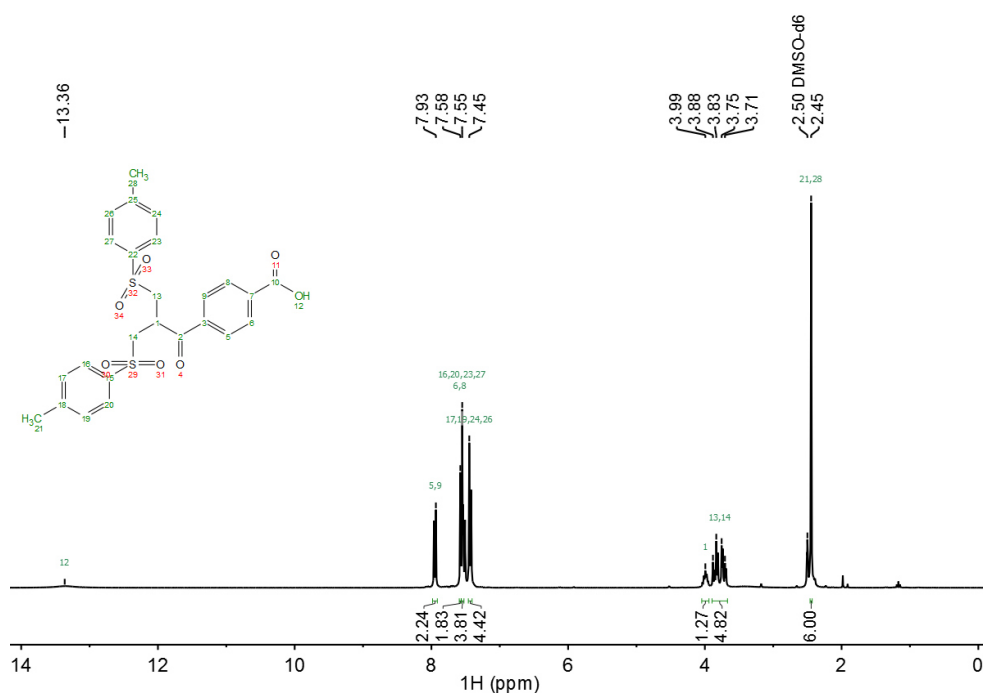


Abbildung 12-74: ¹H-NMR-Spektrum von Bissulfon 56

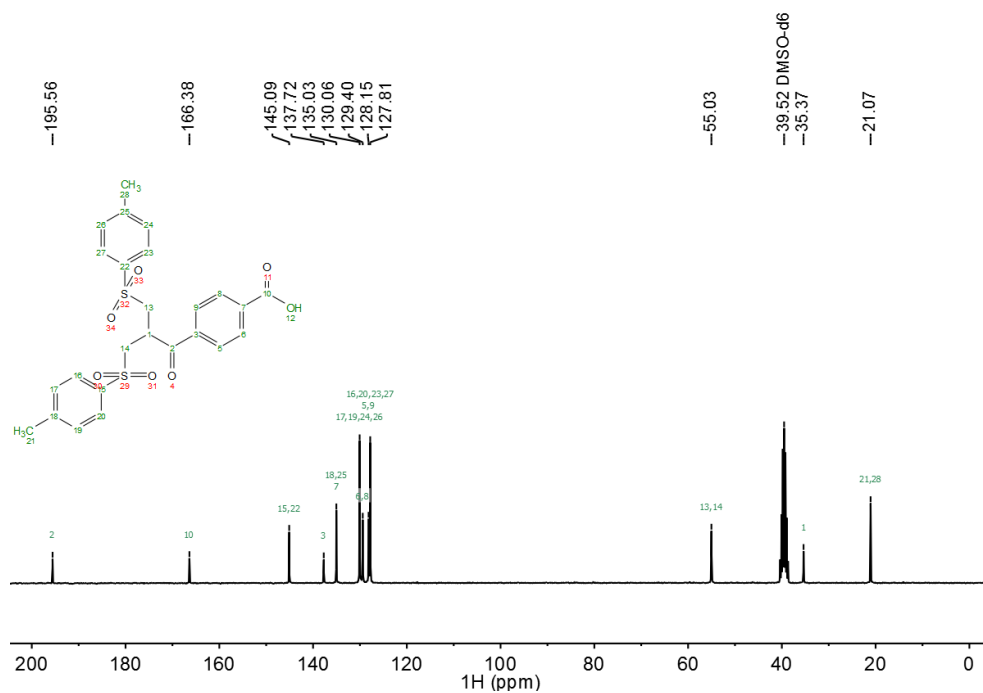


Abbildung 12-75: ¹³C-NMR-Spektrum von Bissulfon 56.

12.35. HPLC- und MS-Daten der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung 57 und 58

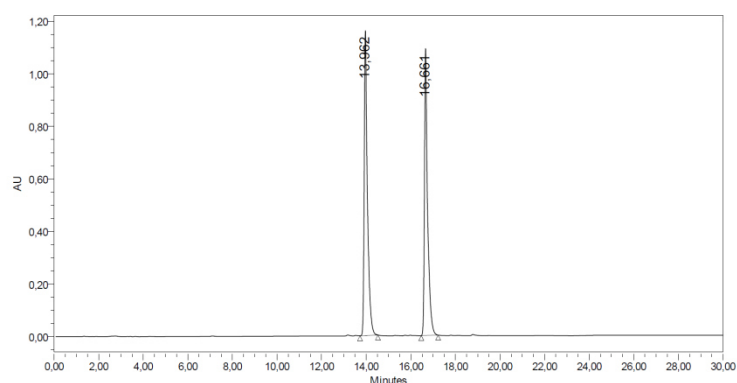


Abbildung 12-76: HPLC-Chromatogramm der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung **57** und **58** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

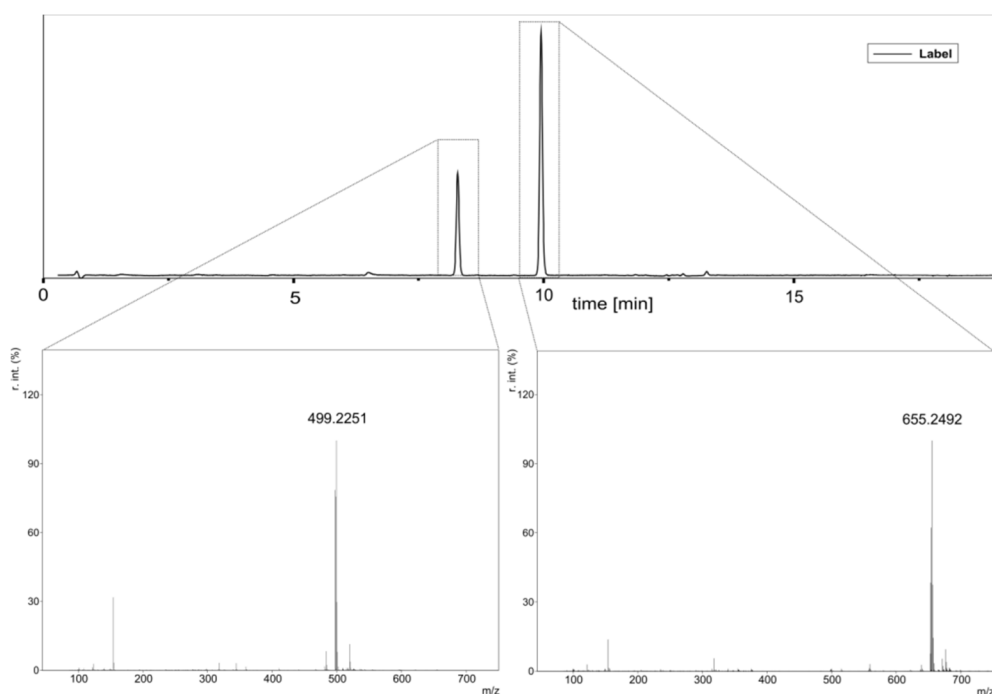


Abbildung 12-77: HPLC-ESI-MS der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung **57** und **58** bei 180-400 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 90 % mit 0,1 % Ameisensäure für 20 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

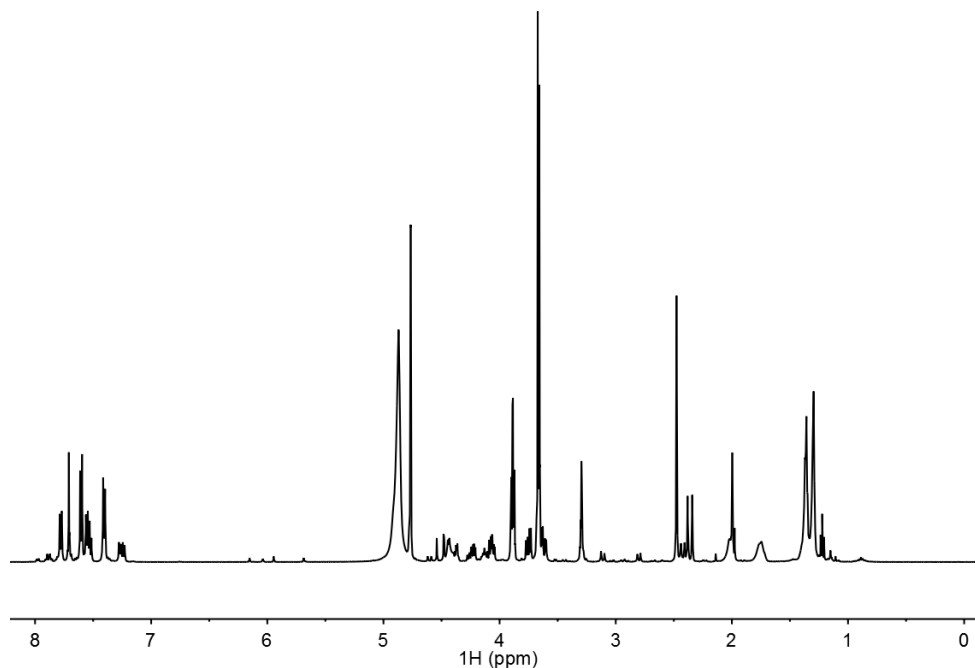


Abbildung 12-78: ^1H -NMR-Spektrum der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung **57** und **58**.

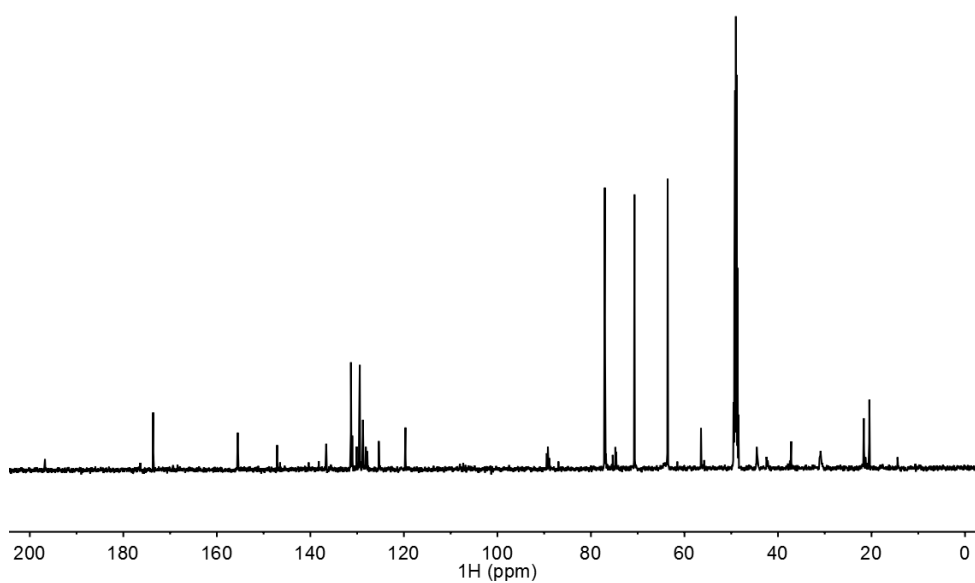


Abbildung 12-79: ^{13}C -NMR-Spektrum der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung **57** und **58**.

12.36. HPLC-, MS- und NMR-Daten der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung **59** und **60**

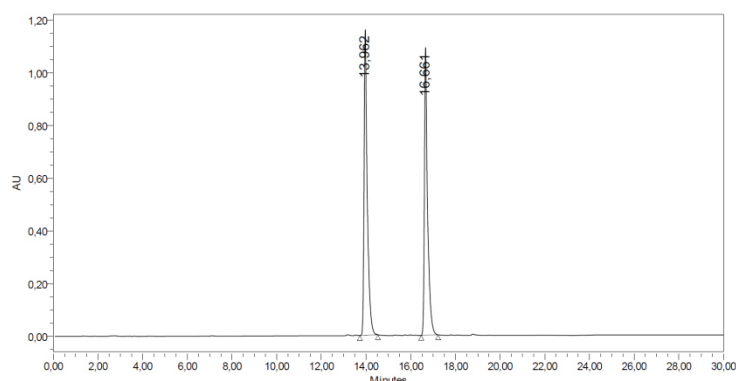


Abbildung 12-80: HPLC-Chromatogramm der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung **59** und **60** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

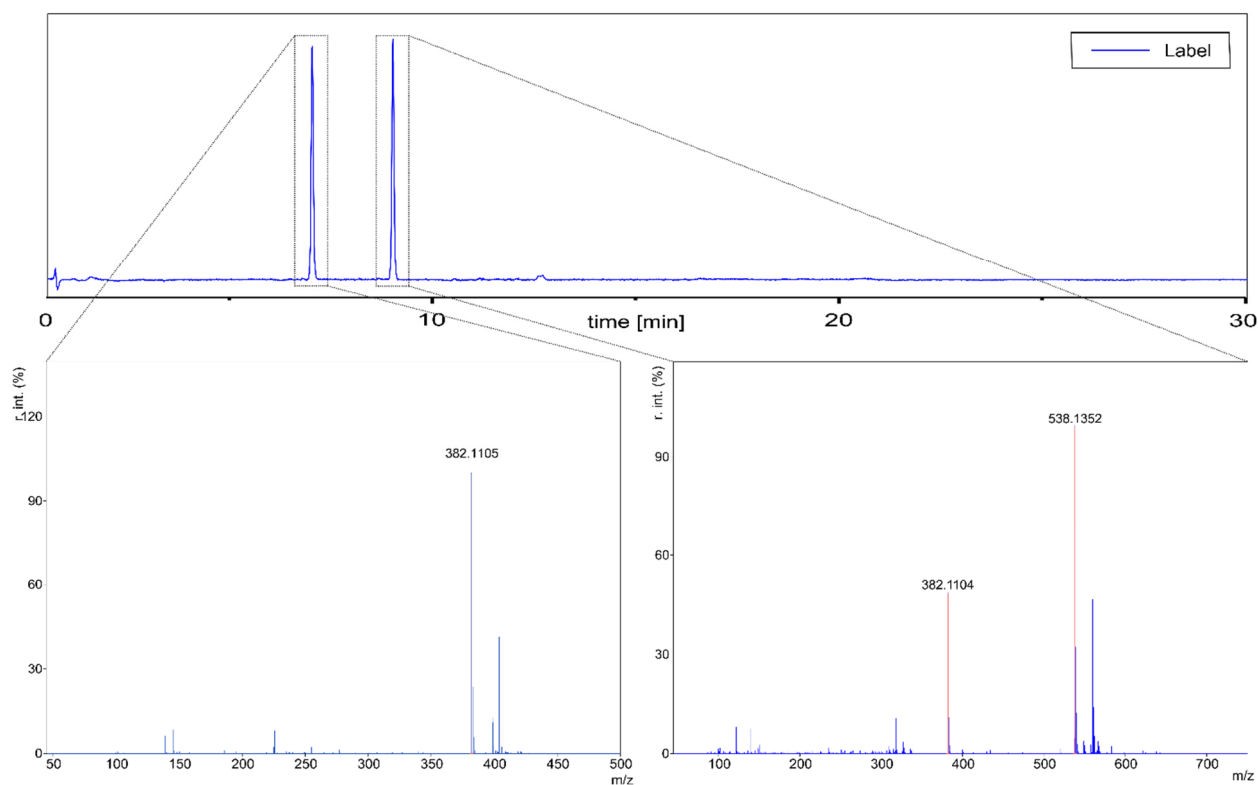


Abbildung 12-81: HPLC-ESI-MS der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung **59** und **60** bei 180-400 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 90 % mit 0,1 % Ameisensäure für 20 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min.

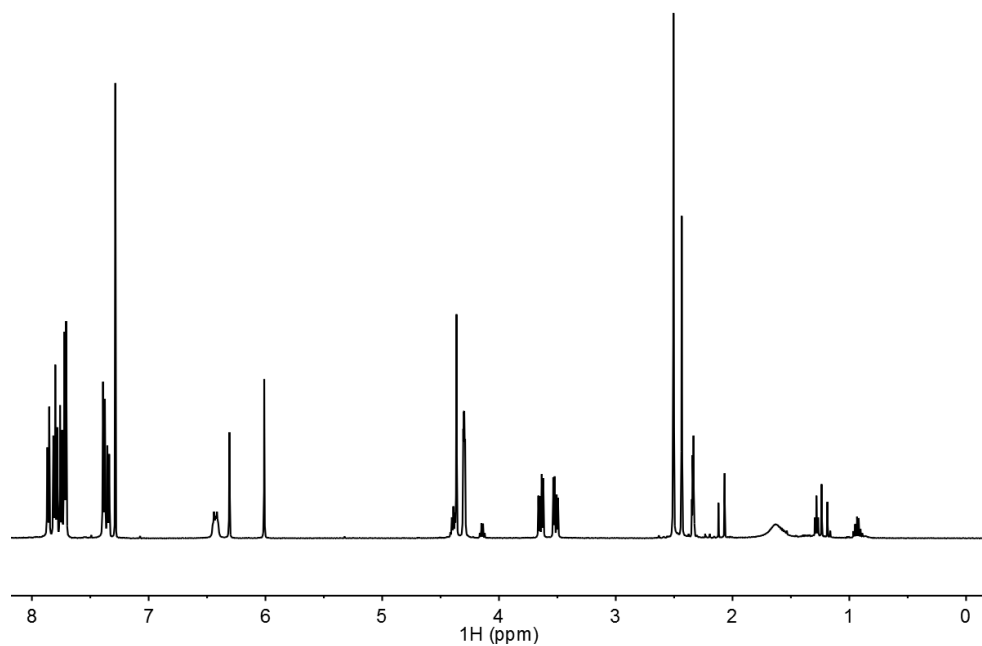


Abbildung 12-82: ^1H -NMR-Spektrum der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung **59** und **60**.

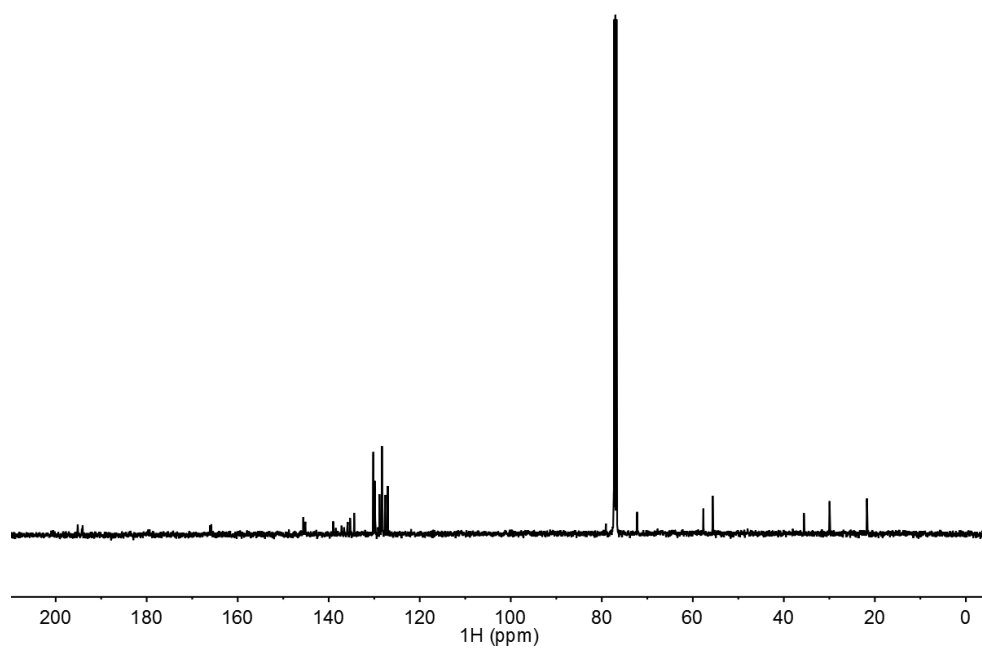


Abbildung 12-83: ^{13}C -NMR-Spektrum der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung **59** und **60**.

12.37. HPLC- und MS-Daten des reduzierten Eptifibatid 61

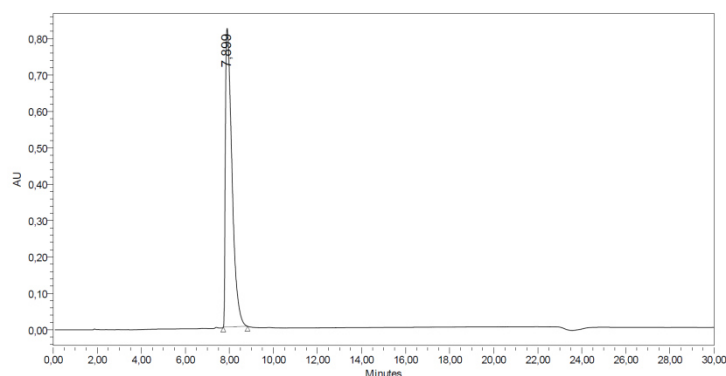


Abbildung 12-84: HPLC-Chromatogramm des reduzierten Eptifibatid **61** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

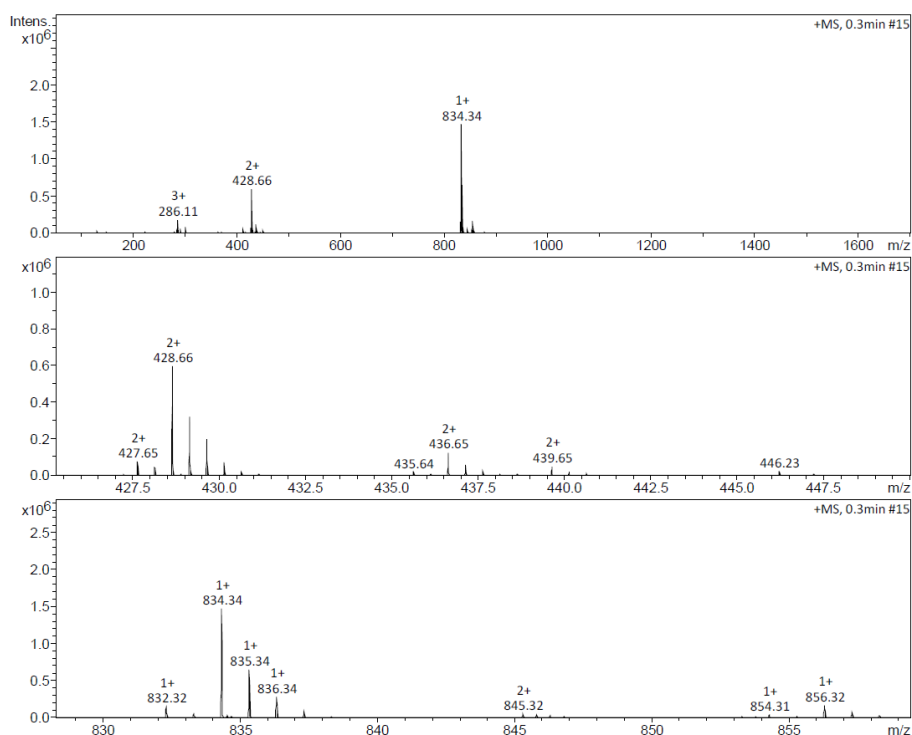


Abbildung 12-85: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs des reduzierten Eptifibatid **61**.

12.38. HPLC- und MS-Daten des Radikal-markierten Eptifibatid 62

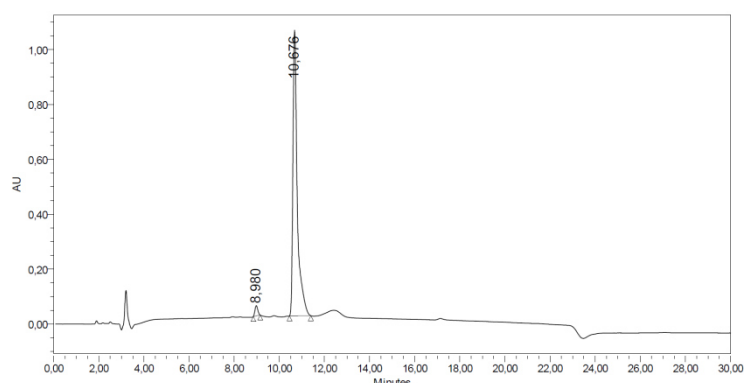


Abbildung 12-86: HPLC-Chromatogramm des Radikal-markierten Eptifibatid **62** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 20 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

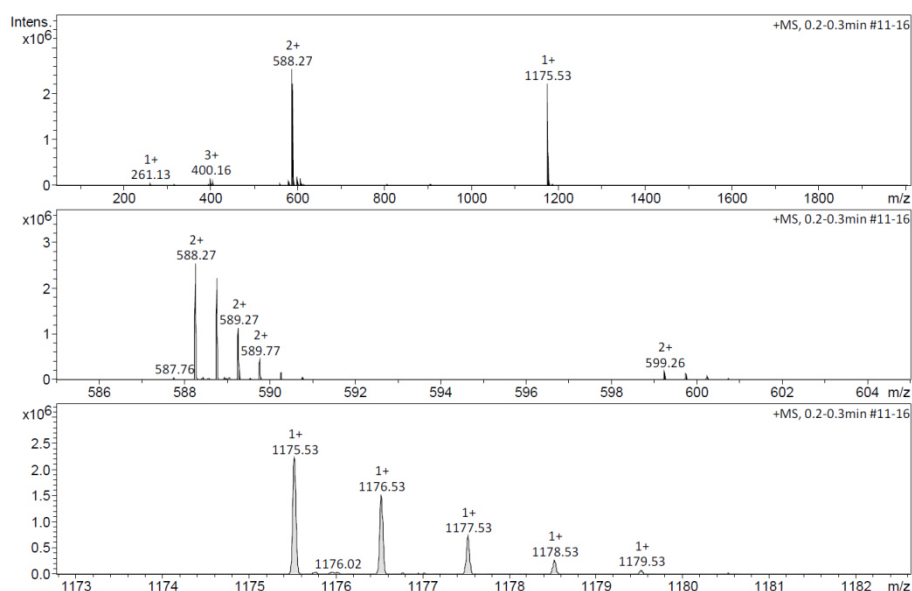


Abbildung 12-87: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs des Radikal-markierten Eptifibatid **62**.

12.39. HPLC- und MS-Daten des Allyl-markierten Eptifibatid 68

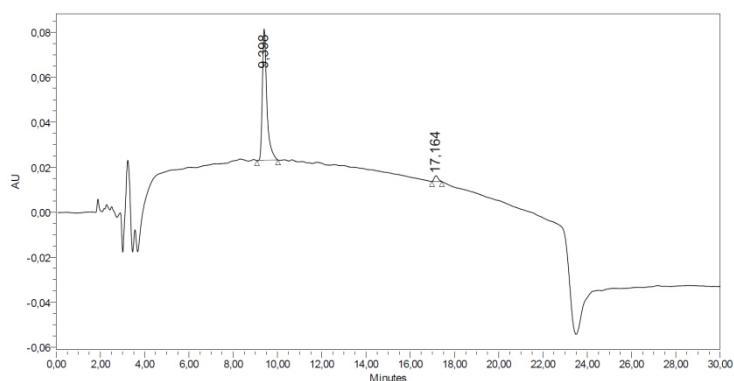


Abbildung 12-88: HPLC-Chromatogramm des Allyl-markierten Eptifibatid **68** bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 20 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.

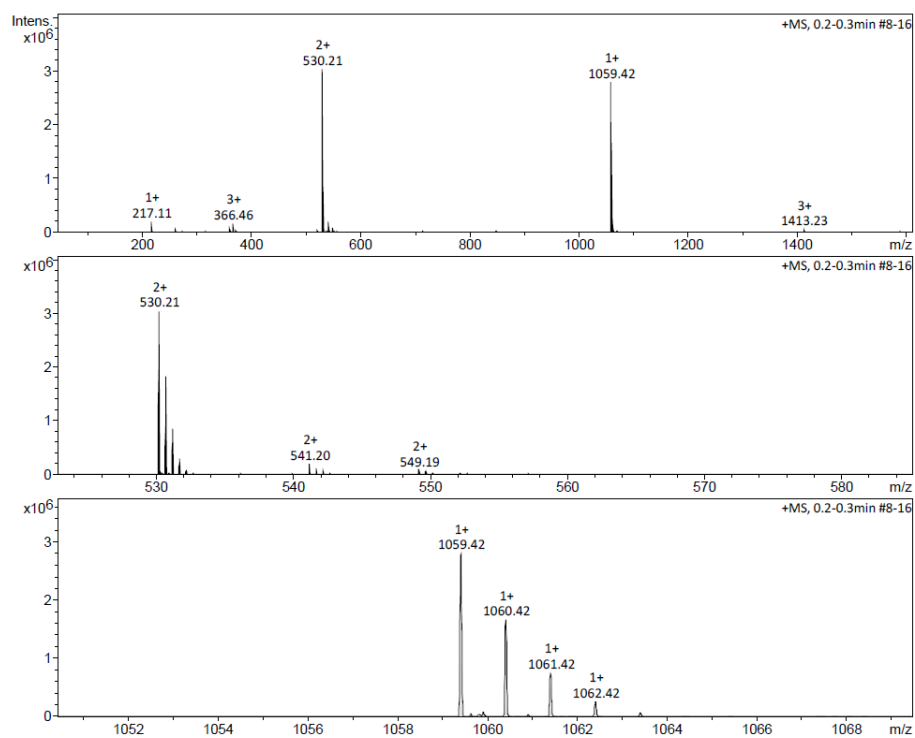


Abbildung 12-89: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs des Allyl-markierten Eptifibatid **68**.

Abkürzungsverzeichnis

AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
AK	Arbeitskreis
AMUPol	(15-{[(7-oxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadec-15-yl)carbamoyl][2-(2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ylamino)}-[3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadec-7-yl])oxidanyl
Aq	<i>aqueous solution</i>
Asp, D	Asparaginsäure
bis-MTSSL	Trans-3,4-Bis[[(methylsulfonyl)thio]methyl]-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-yloxy
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
Boc-Anhydrid	Bis(2-methyl-2-propanyl)dicarbonat
BS	Baustein
CBP	4-Carboxybenzophenon
CE	<i>cross effect</i>
CP	<i>cross polarization</i>
CSA	<i>Chemical-Shift-Anisotropie</i>
CTC	2-Chlorotriethylchlorid
CW	<i>continuous wave</i>
CIDNP	<i>chemically induced dynamic nuclear polarization</i>
DCM	<i>Dichlormethan</i>
dest.	Destilliert
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamine
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNP	<i>dynamic nuclear polarization</i>
DP	2,2-Dipyridyl
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>

EDC	1-Ethyl-3-(3- dimethylaminopropyl)carbodiimid
EE	Essigsäureethylester
ESR	Elektronenspinresonanz,
ESI	Elektrosprayionisation
EPR	<i>electron paramagnetic resonance</i>
FID	<i>free induction decay</i>
Fmoc	Fluorenylmethoxycarbonyl
Glu, E	Glutaminsäure
Gly, G	Glycin
HATU	O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium- hexafluorophosphat
His, H	Histidin
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
Hyp	Hydroxyprolin
ISC	<i>inter system crossing</i>
Lys, K	Lysin
Met, M	Methionin
MAS	<i>magic angle spinning</i>
mCPBA	meta-Chlorperbenzoesäure
MTSL	S-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methanesulfonothioate
MAS	<i>magic angle spinning</i>
MD	<i>molecular dynamics</i>
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i>
MRT	Magnetischeresonanztomographie
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
OE	OVERHAUSER-Effekt
o-H ₂	Orthowasserstoff
PDA	<i>photodiode array</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p-H ₂	Parawasserstoff
PHIP	<i>para-hydrogen induced polarization</i>

ppm	<i>parts per million</i>
Pro, P	Prolin
PROXYL	2,2,5,5-tetramethyl-1-pyrrolidinyloxy
PS	Polystyrol
PYPol	(15-{[(7oxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadec-15-yl)carbamoyl]amino}c-[3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadec-7-yl])oxidanyl
quant	quantitativ
REMD	<i>replica exchange molecular dynamics</i>
RFBR	<i>Russian Foundation for Basic Research</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RP	<i>reversed phase</i>
RPM	Radikalpaar-Mechanismus
RT	Raumtemperatur
SABRE	<i>signal amplification by reversible exchange</i>
SE	<i>solid effect</i>
SEOP	<i>spin-exchange optical pumping</i>
Ser, S	Serin
SG	Schutzgruppe
SG _p	permanente Schutzgruppe
SG _t	temporäre Schutzgruppe
SK	Seitenkette
SPPS	<i>Solid-Phase Peptide Synthesis</i>
ssNMR	<i>solid state NMR</i>
^t Bu	<i>tert</i> -Butyl
^t Butyl	<i>tert</i> -Butyl
TCBP	3,3',4,4'-Tetracarboxybenzophenon
TCE	Tetrachlorethan
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoessäure
TOAC	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin- <i>N</i> -oxid-4-amino-4-carboxylsäure
TOTAPOL	(1-[(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxidopiperidin-4-yl)amino]-3-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxopiperidin-1-ium-4-yl)oxypropan-2-ol)
Trp, W	Tryptophan

Tyr, Y	Tyrosin
UV	Ultraviolettstrahlung
B	Magnetfeld
B ₀	externes Magnetfeld
β	Bohrsches Magneton
D	Farbstoff
¹ D*	Singulett-Vorläufer des Farbstoffes
³ D*	Triplett-Vorläufer des Farbstoffes
ε	DNP-Verstärkungsfaktor
g	dimenensionsloser Faktor zur Umgebungsbeschreibung eines ungepaarten Elektrons
g _e	dimenensionsloser Faktor für ein freies Elektron
γ	gyromagnetisches Verhältnis
h	Stunden
h	Planck-Konstante
ħ	reduzierte Planck-Konstante
Hz	Hertz
I	Kernspin
K	Kelvin
L	Liter
k _B	Boltzmann-Konstante
m	Meter
M	Molarität
m _I	magnetische Kernspinquantenzahl
min	Minute
m _s	magnetische Elektronenspinquantenzahl
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
n	Besetzungszahlen
N	Kern
Q	Quencher
ν	Frequenz
P	Spinpolarisation
pK _a	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
s	Sekunde
S	Elektronenspin
T	Tesla

Literaturverzeichnis

1. Mao, J.; Akhmetzyanov, D.; Ouari, O.; Denysenkov, V.; Corzilius, B. r.; Plackmeyer, J. r.; Tordo, P.; Prisner, T. F.; Glaubitz, C., Host–Guest Complexes as Water-Soluble High-Performance DNP Polarizing Agents. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135* (51), 19275-19281.
2. Jaudzems, K.; Polenova, T.; Pintacuda, G.; Oschkinat, H.; Lesage, A., DNP NMR of biomolecular assemblies. *Journal of structural biology* **2019**, *206* (1), 90-98.
3. Jacso, T.; Franks, W. T.; Rose, H.; Fink, U.; Broecker, J.; Keller, S.; Oschkinat, H.; Reif, B., Characterization of membrane proteins in isolated native cellular membranes by Dynamic Nuclear Polarization Solid-State NMR spectroscopy without purification and reconstitution. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (2), 432-435.
4. Höfer, P.; Carl, P.; Guthausen, G.; Prisner, T.; Reese, M.; Carlomagno, T.; Griesinger, C.; Bennati, M., Studies of dynamic nuclear polarization with nitroxides in aqueous solution. *Applied Magnetic Resonance* **2008**, *34* (3-4), 393.
5. van der Cruisen, E. A.; Koers, E. J.; Sauvée, C.; Hulse, R. E.; Weingarth, M.; Ouari, O.; Perozo, E.; Tordo, P.; Baldus, M., Biomolecular DNP-Supported NMR Spectroscopy using Site-Directed Spin Labeling. *Chemistry–A European Journal* **2015**, *21* (37), 12971-12977.
6. Lilly Thankamony, A. S.; Wittmann, J. J.; Kaushik, M.; Corzilius, B., Dynamic nuclear polarization for sensitivity enhancement in modern solid-state NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2017**, *102-103* (Supplement C), 120-195.
7. Corzilius, B., High-Field Dynamic Nuclear Polarization. *Annual review of physical chemistry* **2020**, *71*.
8. Daube, D.; Vogel, M.; Suess, B.; Corzilius, B., Dynamic nuclear polarization on a hybridized hammerhead ribozyme: an explorative study of RNA folding and direct DNP with a paramagnetic metal ion cofactor. *Solid state nuclear magnetic resonance* **2019**, *101*, 21-30.
9. Hoffmann, M. M.; Bothe, S.; Brodrecht, M.; Klimavicius, V.; Haro-Mares, N. B.; Gutmann, T.; Buntkowsky, G., Direct and indirect dynamic nuclear polarization transfer observed in mesoporous materials impregnated with nonionic surfactant solutions of polar polarizing agents. *The Journal of Physical Chemistry C* **2020**, *124* (9), 5145-5156.
10. Bargon, J.; Fischer, H.; Johnsen, U., Nuclear magnetic resonance emission lines during fast radical reactions. I. Recording methods and examples. *Z. Naturforsch. A* **1967**, *22*, 1551-1555.
11. Bargon, J.; Fischer, H., Nuclear magnetic resonance emission lines during fast radical reactions. II. Chemically induced dynamic nuclear polarization. *Z. Naturforsch. A* **1967**, *22*, 1556-1562.
12. Kaptein, R.; Oosterhoff, J., Chemically induced dynamic nuclear polarization II:(Relation with anomalous ESR spectra). *Chemical Physics Letters* **1969**, *4* (4), 195-197.
13. Morozova, O. B.; Ivanov, K. L., Time-Resolved Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarization of Biologically Important Molecules. *ChemPhysChem* **2019**, *20* (2), 197-215.
14. Bielytskyi, P.; Gräsing, D.; Mote, K. R.; Gupta, K. B. S. S.; Vega, S.; Madhu, P.; Alia, A.; Matysik, J., $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$ transfer of light-induced hyperpolarization allows for selective detection of protons in frozen photosynthetic reaction center. *Journal of Magnetic Resonance* **2018**, *293*, 82-91.
15. Ivanov, K. L.; Wagenpfahl, A.; Deibel, C.; Matysik, J., Spin-chemistry concepts for spintronics scientists. *Beilstein journal of nanotechnology* **2017**, *8* (1), 1427-1445.
16. Pravdivtsev, A. N.; Buntkowsky, G.; Duckett, S. B.; Koptug, I. V.; Hövener, J.-B., Parahydrogen-Induced Polarization of Amino Acids. *Angewandte Chemie International Edition* **2021**.
17. Sauer, G.; Nasu, D.; Tietze, D.; Gutmann, T.; Englert, S.; Avrutina, O.; Kolmar, H.; Buntkowsky, G., Effektive Markierung von bioaktiven Peptiden mit PHIP-Markern zur

- Steigerung der Empfindlichkeit von NMR-Signalen. *Angewandte Chemie* **2014**, 126 (47), 13155-13159.
18. Kuhn, L. T.; Akbey, Ü., *Hyperpolarization methods in NMR spectroscopy*. Springer: 2013; Vol. 338.
19. Kuhn, L. T.; Bargon, J., Transfer of parahydrogen-induced hyperpolarization to heteronuclei. *In Situ NMR Methods in Catalysis* **2006**, 25-68.
20. Mangion, I.; Liu, Y.; Reibarkh, M.; Williamson, R. T.; Welch, C. J., Using Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy To Facilitate Problem Solving in Pharmaceutical Research and Development. *The Journal of Organic Chemistry* **2016**, 81 (16), 6937-6944.
21. Halse, M. E., Perspectives for hyperpolarisation in compact NMR. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, 83, 76-83.
22. Zurlo, E.; Bikandi, I. G.; Meeuwenoord, N.; Filippov, D.; Huber, M., Tracking amyloid oligomerization with monomer resolution using a 13-amino acid peptide with a backbone-fixed spin label. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2019**, 21 (45), 25187-25195.
23. Yeh, F.-L.; Tung, L.; Chang, T.-H., Detection of protein-protein interaction within an RNA-protein complex via unnatural-amino-acid-mediated photochemical crosslinking. In *RNA-Protein Complexes and Interactions*, Springer: 2016; pp 175-189.
24. Zegota, M. M.; Wang, T.; Seidler, C.; Wah Ng, D. Y.; Kuan, S. L.; Weil, T., "Tag and Modify" protein conjugation with dynamic covalent chemistry. *Bioconjugate Chemistry* **2018**, 29 (8), 2665-2670.
25. Wang, H.; Gao, H.; Guo, N.; Niu, G.; Ma, Y.; Kiesewetter, D. O.; Chen, X., Site-specific labeling of scVEGF with fluorine-18 for positron emission tomography imaging. *Theranostics* **2012**, 2 (6), 607.
26. Sahoo, H., Fluorescent labeling techniques in biomolecules: a flashback. *Rsc Advances* **2012**, 2 (18), 7017-7029.
27. Chalker, J. M.; Bernardes, G. J.; Davis, B. G., A "tag-and-modify" approach to site-selective protein modification. *Accounts of chemical research* **2011**, 44 (9), 730-741.
28. Wu, Y. W.; Goody, R. S., Probing protein function by chemical modification. *Journal of Peptide Science* **2010**, 16 (10), 514-523.
29. Jackson, J. C.; Hammill, J. T.; Mehl, R. A., Site-specific incorporation of a ¹⁹F-amino acid into proteins as an NMR probe for characterizing protein structure and reactivity. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, 129 (5), 1160-1166.
30. Link, A. J.; Mock, M. L.; Tirrell, D. A., Non-canonical amino acids in protein engineering. *Current opinion in biotechnology* **2003**, 14 (6), 603-609.
31. Merrifield, R. B., Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85 (14), 2149-2154.
32. Atherton, E.; Bury, C.; Sheppard, R.; Williams, B., Stability of fluorenylmethoxycarbonylamino groups in peptide synthesis. Cleavage by hydrogenolysis and by dipolar aprotic solvents. *Tetrahedron Letters* **1979**, 20 (32), 3041-3042.
33. Vuong, W.; Mosquera-Guagua, F.; Sanichar, R.; McDonald, T. R.; Ernst, O. P.; Wang, L.; Vederas, J. C., Synthesis of Chiral Spin-Labeled Amino Acids. *Organic Letters* **2019**, 21 (24), 10149-10153.
34. Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F., TOAC, a nitroxide spin-labeled, achiral α -tetrasubstituted α -amino acid, is an excellent tool in material science and biochemistry. *Peptide Science* **1998**, 47 (2), 153-158.
35. Dawson, P. E.; Kent, S. B., Synthesis of native proteins by chemical ligation. *Annual review of biochemistry* **2000**, 69 (1), 923-960.
36. Gan, R.; Perez, J. G.; Carlson, E. D.; Ntai, I.; Isaacs, F. J.; Kelleher, N. L.; Jewett, M. C., Translation system engineering in *Escherichia coli* enhances non-canonical amino acid incorporation into proteins. *Biotechnology and bioengineering* **2017**, 114 (5), 1074-1086.
37. Miyake-Stoner, S. J.; Miller, A. M.; Hammill, J. T.; Peeler, J. C.; Hess, K. R.; Mehl, R. A.; Brewer, S. H., Probing protein folding using site-specifically encoded unnatural amino acids as FRET donors with tryptophan. *Biochemistry* **2009**, 48 (25), 5953-5962.

-
38. Lee, H. S.; Dimla, R. D.; Schultz, P. G., Protein–DNA photo-crosslinking with a genetically encoded benzophenone-containing amino acid. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009**, *19* (17), 5222-5224.
39. Vitzthum, V.; Borcard, F.; Jannin, S.; Morin, M.; Miéville, P.; Caporini, M. A.; Sienkiewicz, A.; Gerber-Lemaire, S.; Bodenhausen, G., Fractional Spin-Labeling of Polymers for Enhancing NMR Sensitivity by Solvent-Free Dynamic Nuclear Polarization. *ChemPhysChem* **2011**, *12* (16), 2929-2932.
40. Berliner, L. J.; Grunwald, J.; Hankovszky, H. O.; Hideg, K., A novel reversible thiol-specific spin label: papain active site labeling and inhibition. *Analytical biochemistry* **1982**, *119* (2), 450-455.
41. Jaroniec, C. P., Structural studies of proteins by paramagnetic solid-state NMR spectroscopy. *Journal of Magnetic Resonance* **2015**, *253*, 50-59.
42. Lösel, R. M.; Philipp, R.; Kálai, T.; Hideg, K.; Trommer, W. E., Synthesis and application of novel bifunctional spin labels. *Bioconjugate chemistry* **1999**, *10* (4), 578-582.
43. Savich, Y.; Binder, B. P.; Thompson, A. R.; Thomas, D. D., Myosin lever arm orientation in muscle determined with high angular resolution using bifunctional spin labels. *Journal of General Physiology* **2019**, *151* (8), 1007-1016.
44. Badescu, G.; Bryant, P.; Bird, M.; Henseleit, K.; Swierkosz, J.; Parekh, V.; Tommasi, R.; Pawlisz, E.; Jurlewicz, K.; Farys, M., Bridging disulfides for stable and defined antibody drug conjugates. *Bioconjugate chemistry* **2014**, *25* (6), 1124-1136.
45. Zhang, Y.; Zang, C.; An, G.; Shang, M.; Cui, Z.; Chen, G.; Xi, Z.; Zhou, C., Cysteine-specific protein multi-functionalization and disulfide bridging using 3-bromo-5-methylene pyrrolones. *Nature communications* **2020**, *11* (1), 1-10.
46. Zhou, Y.; Chakraborty, S.; Liu, S., Radiolabeled cyclic RGD peptides as radiotracers for imaging tumors and thrombosis by SPECT. *Theranostics* **2011**, *1*, 58.
47. Mousavizadeh, A.; Jabbari, A.; Akrami, M.; Bardania, H., Cell targeting peptides as smart ligands for targeting of therapeutic or diagnostic agents: a systematic review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2017**, *158*, 507-517.
48. Bakker, W.; Albert, R.; Bruns, C.; Breeman, W.; Hofland, L.; Marbach, P.; Pless, J.; Pralet, D.; Stolz, B.; Koper, J., [111In-DTPA-D-Phe1]-octreotide, a potential radiopharmaceutical for imaging of somatostatin receptor-positive tumors: synthesis, radiolabeling and in vitro validation. *Life sciences* **1991**, *49* (22), 1583-1591.
49. Zhang, J.; Mu, Y.-L.; Ma, Z.-Y.; Han, K.; Han, H.-Y., Tumor-triggered transformation of chimeric peptide for dual-stage-amplified magnetic resonance imaging and precise photodynamic therapy. *Biomaterials* **2018**, *182*, 269-278.
50. Yuan, Z.; Nodwell, M. B.; Yang, H.; Malik, N.; Merkens, H.; Bénard, F.; Martin, R. E.; Schaffer, P.; Britton, R., Site-Selective, Late-Stage C–H ¹⁸F-Fluorination on Unprotected Peptides for Positron Emission Tomography Imaging. *Angewandte Chemie International Edition* **2018**, *57* (39), 12733-12736.
51. Ardenkjær-Larsen, J. H.; Fridlund, B.; Gram, A.; Hansson, G.; Hansson, L.; Lerche, M. H.; Servin, R.; Thaning, M.; Golman, K., Increase in signal-to-noise ratio of > 10,000 times in liquid-state NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, *100* (18), 10158-10163.
52. Golman, K.; Zandt, R., in 't; Thaning. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 11270-11275.
53. Nelson, S.; Vigneron, D.; Kurhanewicz, J.; Chen, A.; Bok, R.; Hurd, R., DNP-hyperpolarized ¹³C magnetic resonance metabolic imaging for cancer applications. *Applied magnetic resonance* **2008**, *34* (3-4), 533-544.
54. Hurd, R. E.; Yen, Y. F.; Chen, A.; Ardenkjaer-Larsen, J. H., Hyperpolarized ¹³C metabolic imaging using dissolution dynamic nuclear polarization. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* **2012**, *36* (6), 1314-1328.
-

55. Bastiaansen, J. A.; Cheng, T.; Lei, H.; Gruetter, R.; Comment, A., Direct noninvasive estimation of myocardial tricarboxylic acid cycle flux in vivo using hyperpolarized ^{13}C magnetic resonance. *Journal of molecular and cellular cardiology* **2015**, *87*, 129-137.
56. Ardenkjaer-Larsen, J. H., On the present and future of dissolution-DNP. *Journal of Magnetic Resonance* **2016**, *264*, 3-12.
57. FSmythe, M. L.; Nakaie, C. R.; Marshall, G. R., . α -Helical versus 3_{10} -Helical Conformation of Alanine-Based Peptides in Aqueous Solution: An Electron Spin Resonance Investigation. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117* (42), 10555-10562.
58. Gerolin, M.; Zerbetto, M.; Moretto, A.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; van Son, M.; Shabestari, M. H.; Huber, M.; Calligari, P.; Polimeno, A., Integrated Computational Approach to the Electron Paramagnetic Resonance Characterization of Rigid 3_{10} -Helical Peptides with TOAC Nitroxide Spin Labels. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121* (17), 4379-4387.
59. Polese, A.; Anderson, D. J.; Millhauser, G.; Formaggio, F.; Crisma, M.; Marchiori, F.; Toniolo, C., First interchain peptide interaction detected by ESR in fully synthetic, template-assisted, two-helix bundles. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121* (48), 11071-11078.
60. Brocchini, S.; Godwin, A.; Balan, S.; Choi, J.-w.; Zloh, M.; Shaunak, S., Disulfide bridge based PEGylation of proteins. *Advanced drug delivery reviews* **2008**, *60* (1), 3-12.
61. Brocchini, S.; Balan, S.; Godwin, A.; Choi, J.-W.; Zloh, M.; Shaunak, S., PEGylation of native disulfide bonds in proteins. *Nature Protocols* **2006**, *1* (5), 2241-2252.
62. Liberatore, F. A.; Comeau, R. D.; McKearin, J. M.; Pearson, D. A.; Belonga III, B. Q.; Brocchini, S. J.; Kath, J.; Phillips, T.; Oswell, K.; Lawton, R. G., Site-directed chemical modification and crosslinking of a monoclonal antibody using equilibrium transfer alkylating crosslink reagents. *Bioconjugate chemistry* **1990**, *1* (1), 36-50.
63. Pfisterer, A.; Eisele, K.; Chen, X.; Wagner, M.; Müllen, K.; Weil, T., Bioactive Unnatural Somatostatin Analogues through Bioorthogonal Iodo-and Ethynyl-Disulfide Intercalators. *Chemistry—A European Journal* **2011**, *17* (35), 9697-9707.
64. Godwin, A.; Choi, J. W.; Pedone, E.; Balan, S.; Jumnah, R.; Shaunak, S.; Brocchini, S.; Zloh, M., Molecular dynamics simulations of proteins with chemically modified disulfide bonds. *Theoretical Chemistry Accounts* **2007**, *117* (2), 259-265.
65. Kolb, H. C.; Finn, M.; Sharpless, K. B., Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40* (11), 2004-2021.
66. Lowe, A. B., Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry* **2010**, *1* (1), 17-36.
67. Breinbauer, R.; Köhn, M., Azide-alkyne coupling: a powerful reaction for bioconjugate chemistry. *ChemBioChem* **2003**, *4* (11), 1147-1149.
68. Bloch, F., Nuclear induction. *Physical review* **1946**, *70* (7-8), 460.
69. Purcell, E. M.; Torrey, H. C.; Pound, R. V., Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical review* **1946**, *69* (1-2), 37.
70. Pines, A.; Gibby, M.; Waugh, J., Proton-enhanced nuclear induction spectroscopy. A method for high resolution NMR of dilute spins in solids. *The Journal of Chemical Physics* **1972**, *56* (4), 1776-1777.
71. Pines, A.; Gibby, M. G.; Waugh, J., Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids. *The Journal of Chemical Physics* **1973**, *59* (2), 569-590.
72. Andrew, E.; Bradbury, A.; Eades, R., NMR spectra recorded from a crystal rotated at high speed. *Nature* **1958**, *182*, 1659.
73. Lowe, I., Free induction decays of rotating solids. *Physical Review Letters* **1959**, *2* (7), 285.
74. Andrew, E.; Bradbury, A.; Eades, R., Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature* **1959**, *183* (4678), 1802-1803.
75. Bleaney, B.; Stevens, K., Paramagnetic resonance. *Reports on Progress in Physics* **1953**, *16* (1), 108.

-
76. Sahu, I. D.; McCarrick, R. M.; Lorigan, G. A., Use of electron paramagnetic resonance to solve biochemical problems. *Biochemistry* **2013**, 52 (35), 5967-5984.
77. Lesage, A.; Lelli, M.; Gajan, D.; Caporini, M. A.; Vitzthum, V.; Miéville, P.; Alauzun, J.; Roussey, A.; Thieuleux, C.; Mehdi, A., Surface enhanced NMR spectroscopy by dynamic nuclear polarization. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132 (44), 15459-15461.
78. Rossini, A. J.; Zagdoun, A.; Lelli, M.; Lesage, A.; Coperet, C.; Emsley, L., Dynamic nuclear polarization surface enhanced NMR spectroscopy. *Accounts of chemical research* **2013**, 46 (9), 1942-1951.
79. Hu, K.-N.; Yu, H.-h.; Swager, T. M.; Griffin, R. G., Dynamic nuclear polarization with biradicals. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, 126 (35), 10844-10845.
80. Maly, T.; Debelouchina, G. T.; Bajaj, V. S.; Hu, K.-N.; Joo, C.-G.; Mak-Jurkauskas, M. L.; Sirigiri, J. R.; van der Wel, P. C.; Herzfeld, J.; Temkin, R. J., Dynamic nuclear polarization at high magnetic fields. *The Journal of chemical physics* **2008**, 128 (5), 02B611.
81. Lelli, M.; Gajan, D.; Lesage, A.; Caporini, M. A.; Vitzthum, V.; Miéville, P.; Héroguel, F.; Rascón, F.; Roussey, A.; Thieuleux, C., Fast characterization of functionalized silica materials by silicon-29 surface-enhanced NMR spectroscopy using dynamic nuclear polarization. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133 (7), 2104-2107.
82. Rossini, A. J.; Zagdoun, A.; Lelli, M.; Gajan, D.; Rascón, F.; Rosay, M.; Maas, W. E.; Copéret, C.; Lesage, A.; Emsley, L., One hundred fold overall sensitivity enhancements for Silicon-29 NMR spectroscopy of surfaces by dynamic nuclear polarization with CPMG acquisition. *Chemical Science* **2012**, 3 (1), 108-115.
83. Zagdoun, A.; Casano, G.; Ouari, O.; Lapadula, G.; Rossini, A. J.; Lelli, M.; Baffert, M.; Gajan, D.; Veyre, L.; Maas, W. E., A slowly relaxing rigid biradical for efficient dynamic nuclear polarization surface-enhanced NMR spectroscopy: expeditious characterization of functional group manipulation in hybrid materials. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134 (4), 2284-2291.
84. Samantaray, M. K.; Alauzun, J.; Gajan, D.; Kavitate, S.; Mehdi, A.; Veyre, L.; Lelli, M.; Lesage, A.; Emsley, L.; Copéret, C., Evidence for Metal-Surface Interactions and Their Role in Stabilizing Well-Defined Immobilized Ru-NHC Alkene Metathesis Catalysts. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135 (8), 3193-3199.
85. Conley, M. P.; Drost, R. M.; Baffert, M.; Gajan, D.; Elsevier, C.; Franks, W. T.; Oschkinat, H.; Veyre, L.; Zagdoun, A.; Rossini, A., A Well-Defined Pd Hybrid Material for the Z-Selective Semihydrogenation of Alkynes Characterized at the Molecular Level by DNP SENS. *Chemistry-A European Journal* **2013**, 19 (37), 12234-12238.
86. Kobayashi, T.; Lafon, O.; Thankamony, A. S. L.; Slowing, I. I.; Kandel, K.; Carnevale, D.; Vitzthum, V.; Vezin, H.; Amoureux, J.-P.; Bodenhausen, G., Analysis of sensitivity enhancement by dynamic nuclear polarization in solid-state NMR: a case study of functionalized mesoporous materials. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, 15 (15), 5553-5562.
87. Lafon, O.; Thankamony, A. S. L.; Kobayashi, T.; Carnevale, D.; Vitzthum, V.; Slowing, I. I.; Kandel, K.; Vezin, H.; Amoureux, J.-P.; Bodenhausen, G., Mesoporous silica nanoparticles loaded with surfactant: low temperature magic angle spinning ¹³C and ²⁹Si NMR enhanced by dynamic nuclear polarization. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, 117 (3), 1375-1382.
88. Eedugurala, N.; Wang, Z.; Chaudhary, U.; Nelson, N.; Kandel, K.; Kobayashi, T.; Slowing, I. I.; Pruski, M.; Sadow, A. D., Mesoporous silica-supported amidozirconium-catalyzed carbonyl hydroboration. *Acs Catalysis* **2015**, 5 (12), 7399-7414.
89. Perras, F. d. r. A.; Kobayashi, T.; Pruski, M., Natural abundance ¹⁷O DNP two-dimensional and surface-enhanced NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137 (26), 8336-8339.
90. Gutmann, T.; Liu, J.; Rothermel, N.; Xu, Y.; Jaumann, E.; Werner, M.; Breitzke, H.; Sigurdsson, S. T.; Buntkowsky, G., Natural Abundance ¹⁵N NMR by Dynamic Nuclear

Polarization: Fast Analysis of Binding Sites of a Novel Amine-Carboxyl-Linked Immobilized Dirhodium Catalyst. *Chemistry-A European Journal* **2015**, 21 (9), 3798-3805.

91. Perras, F. A.; Wang, Z.; Naik, P.; Slowing, I. I.; Pruski, M., Natural Abundance 17O DNP NMR Provides Precise O-H Distances and Insights into the Brønsted Acidity of Heterogeneous Catalysts. *Angewandte Chemie* **2017**.

92. Ong, T. C.; Liao, W. C.; Mougél, V.; Gajan, D.; Lesage, A.; Emsley, L.; Copéret, C., Atomistic description of reaction intermediates for supported metathesis catalysts enabled by DNP SENS. *Angewandte Chemie* **2016**, 128 (15), 4821-4825.

93. Wolf, P.; Valla, M.; Rossini, A. J.; Comas-Vives, A.; Núñez-Zarur, F.; Malaman, B.; Lesage, A.; Emsley, L.; Copéret, C.; Hermans, I., NMR Signatures of the Active Sites in Sn- β Zeolite. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, 53 (38), 10179-10183.

94. Wolf, P.; Valla, M.; Nunez-Zarur, F.; Comas-Vives, A.; Rossini, A. J.; Firth, C.; Kallas, H.; Lesage, A.; Emsley, L.; Coperet, C., Correlating synthetic methods, morphology, atomic-level structure, and catalytic activity of Sn- β catalysts. *Acs Catalysis* **2016**, 6 (7), 4047-4063.

95. Rossini, A. J.; Zagdoun, A.; Lelli, M.; Canivet, J.; Aguado, S.; Ouari, O.; Tordo, P.; Rosay, M.; Maas, W. E.; Copéret, C., Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy of Functionalized Metal–Organic Frameworks. *Angewandte Chemie* **2012**, 124 (1), 127-131.

96. Pourpoint, F.; Thankamony, A. S. L.; Volkringer, C.; Loiseau, T.; Trébosc, J.; Aussenac, F.; Carnevale, D.; Bodenhausen, G.; Vezin, H.; Lafon, O., Probing 27 Al–13 C proximities in metal–organic frameworks using dynamic nuclear polarization enhanced NMR spectroscopy. *Chemical Communications* **2014**, 50 (8), 933-935.

97. Guo, Z.; Kobayashi, T.; Wang, L. L.; Goh, T. W.; Xiao, C.; Caporini, M. A.; Rosay, M.; Johnson, D. D.; Pruski, M.; Huang, W., Selective Host–Guest Interaction between Metal Ions and Metal–Organic Frameworks Using Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR Spectroscopy. *Chemistry-A European Journal* **2014**, 20 (49), 16308-16313.

98. Kobayashi, T.; Perras, F. A.; Goh, T. W.; Metz, T. L.; Huang, W.; Pruski, M., DNP-enhanced ultrawideline solid-state NMR spectroscopy: studies of platinum in metal–organic frameworks. *The journal of physical chemistry letters* **2016**, 7 (13), 2322-2327.

99. Protesescu, L.; Rossini, A. J.; Kriegner, D.; Valla, M.; De Kergommeaux, A.; Walter, M.; Kravchyk, K. V.; Nachttegaal, M.; Stangl, J.; Malaman, B., Unraveling the Core–Shell Structure of Ligand-Capped Sn/SnO_x Nanoparticles by Surface-Enhanced Nuclear Magnetic Resonance, Mössbauer, and X-ray Absorption Spectroscopies. *ACS nano* **2014**, 8 (3), 2639-2648.

100. Johnson, R. L.; Perras, F. A.; Kobayashi, T.; Schwartz, T. J.; Dumesic, J. A.; Shanks, B. H.; Pruski, M., Identifying low-coverage surface species on supported noble metal nanoparticle catalysts by DNP-NMR. *Chemical Communications* **2016**, 52 (9), 1859-1862.

101. Mardkhe, M. K.; Keyvanloo, K.; Bartholomew, C. H.; Hecker, W. C.; Alam, T. M.; Woodfield, B. F., Acid site properties of thermally stable, silica-doped alumina as a function of silica/alumina ratio and calcination temperature. *Applied Catalysis A: General* **2014**, 482, 16-23.

102. Valla, M.; Rossini, A. J.; Caillot, M.; Chizallet, C. I.; Raybaud, P.; Digne, M.; Chaumonnot, A.; Lesage, A.; Emsley, L.; Van Bokhoven, J. A., Atomic description of the interface between silica and alumina in aluminosilicates through dynamic nuclear polarization surface-enhanced nmr spectroscopy and first-principles calculations. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, 137 (33), 10710-10719.

103. Mouat, A. R.; George, C.; Kobayashi, T.; Pruski, M.; Van Duyne, R. P.; Marks, T. J.; Stair, P. C., Highly dispersed SiO_x/Al₂O₃ catalysts illuminate the reactivity of isolated silanol sites. *Angewandte Chemie* **2015**, 127 (45), 13544-13549.

104. Morimoto, T.; Nagao, M., Rate of surface hydration on alumina. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere* **1968**, 224 (1), 62-67.

105. Zagdoun, A.; Casano, G.; Ouari, O.; Schwarzwälder, M.; Rossini, A. J.; Aussenac, F.; Yulikov, M.; Jeschke, G.; Copéret, C.; Lesage, A., Large molecular weight nitroxide biradicals

- providing efficient dynamic nuclear polarization at temperatures up to 200 K. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, 135 (34), 12790-12797.
106. Yokoi, T.; Sakamoto, Y.; Terasaki, O.; Kubota, Y.; Okubo, T.; Tatsumi, T., Periodic arrangement of silica nanospheres assisted by amino acids. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128 (42), 13664-13665.
107. Wind, R. A.; Trommel, J.; Smidt, J., Proton dynamic nuclear polarization in coal. *Fuel* **1979**, 58 (12), 900-901.
108. Wind, R. A.; Anthonio, F.; Duijvestijn, M.; Smidt, J.; Trommel, J.; De Vette, G., Experimental setup for enhanced ¹³C NMR spectroscopy in solids using dynamic nuclear polarization. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1983**, 52 (3), 424-434.
109. Jones, R.; Robertson, S.; Clague, A.; Wind, R.; Duijvestijn, M.; Van der Lugt, C.; Vriend, J.; Smidt, J., Dynamic nuclear polarization ¹³C nmr of coal. *Fuel* **1986**, 65 (4), 520-525.
110. Liang, C.; Li, Z.; Dai, S., Mesoporous carbon materials: synthesis and modification. *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47 (20), 3696-3717.
111. Feng, C.; Li, H.; Wan, Y., Fabrication of N-doped highly ordered mesoporous polymers and carbons. *Journal of nanoscience and nanotechnology* **2009**, 9 (2), 1558-1563.
112. Mance, D.; van der Zwan, J.; Velthoen, M. E.; Meirer, F.; Weckhuysen, B. M.; Baldus, M.; Vogt, E. T., A DNP-supported solid-state NMR study of carbon species in fluid catalytic cracking catalysts. *Chemical Communications* **2017**, 53 (28), 3933-3936.
113. Walker, T. G.; Happer, W., Spin-exchange optical pumping of noble-gas nuclei. *Reviews of modern physics* **1997**, 69 (2), 629.
114. Leskes, M.; Kim, G.; Liu, T.; Michan, A. L.; Aussenac, F.; Dorffer, P.; Paul, S.; Grey, C. P., Surface-sensitive NMR detection of the solid electrolyte interphase layer on reduced graphene oxide. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2017**, 8 (5), 1078-1085.
115. Overhauser, A. W., Polarization of nuclei in metals. *Physical Review* **1953**, 92 (2), 411.
116. Overhauser, A. W., Overhauser, A. W.: Dynamic Nuclear Polarization. *eMagRes* **2007**.
117. Carver, T. R.; Slichter, C. P., Polarization of nuclear spins in metals. *Physical Review* **1953**, 92 (1), 212.
118. Carver, T. R.; Slichter, C. P., Experimental verification of the Overhauser nuclear polarization effect. *Physical Review* **1956**, 102 (4), 975.
119. Becerra, L. R.; Gerfen, G. J.; Bellew, B. F.; Bryant, J. A.; Hall, D. A.; Inati, S. J.; Weber, R. T.; Un, S.; Prisner, T. F.; McDermott, A. E., A spectrometer for dynamic nuclear polarization and electron paramagnetic resonance at high frequencies. *Journal of Magnetic Resonance, Series A* **1995**, 117 (1), 28-40.
120. Becerra, L. R.; Gerfen, G. J.; Temkin, R. J.; Singel, D. J.; Griffin, R. G., Dynamic nuclear polarization with a cyclotron resonance maser at 5 T. *Physical Review Letters* **1993**, 71 (21), 3561.
121. Griffin, R.; Prisner, T., High field dynamic nuclear polarization—the renaissance. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, 12 (22), 5737-5740.
122. Casano, G.; Karoui, H.; Ouari, O., Polarizing agents: evolution and outlook in free radical development for DNP. *Handbook of High Field Dynamic Nuclear Polarization* **2019**, 103.
123. Blank, M.; Felch, K. L., Millimeter-Wave Sources for DNP-NMR. *Emagres* **2007**, 155-166.
124. Bothe, S.; Nowag, J.; Klimavičius, V.; Hoffmann, M.; Troitskaya, T. I.; Amosov, E. V.; Tormyshev, V. M.; Kirilyuk, I.; Taratayko, A.; Kuzhelev, A., Novel biradicals for direct excitation highfield dynamic nuclear polarization. *The Journal of Physical Chemistry C* **2018**, 122 (21), 11422-11432.
125. Sato, K.; Hirao, R.; Timofeev, I.; Krumkacheva, O.; Zaytseva, E.; Rogozhnikova, O.; Tormyshev, V. M.; Trukhin, D.; Bagryanskaya, E.; Gutmann, T., Trityl-aryl-nitroxide-based genuinely g-engineered biradicals, as studied by dynamic nuclear polarization, multifrequency

- ESR/ENDOR, arbitrary wave generator pulse microwave waveform spectroscopy, and quantum chemical calculations. *The Journal of Physical Chemistry A* **2019**, 123 (34), 7507-7517.
126. Mandal, S.; Sigurdsson, S. T., Water-soluble BDPA radicals with improved persistence. *Chemical Communications* **2020**, 56 (86), 13121-13124.
127. DeHaven, B. A.; Tokarski, J. T.; Korous, A. A.; Mentink-Vigier, F.; Makris, T. M.; Brugh, A. M.; Forbes, M. D.; van Tol, J.; Bowers, C. R.; Shimizu, L. S., Persistent radicals of self-assembled benzophenone bis-urea macrocycles: Characterization and application as a polarizing agent for solid-state DNP MAS Spectroscopy. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2017**, 23 (34), 8315.
128. Liu, D.; Lei, J.-H.; Guo, L.-P.; Qu, D.; Li, Y.; Su, B.-L., One-pot aqueous route to synthesize highly ordered cubic and hexagonal mesoporous carbons from resorcinol and hexamine. *Carbon* **2012**, 50 (2), 476-487.
129. Gerstein, B.; Chow, C.; Pembleton, R.; Wilson, R., Utility of pulse nuclear magnetic resonance in studying protons in coals. *The Journal of Physical Chemistry* **1977**, 81 (6), 565-570.
130. Malbrel, C. A.; Somasundaran, P.; Turro, N. J., Adsorption of nitroxide spin probes at the alumina/cyclohexane interface in the presence of Aerosol OT. *Langmuir* **1989**, 5 (2), 490-494.
131. Lund, A.; Hsieh, M.-F.; Siaw, T.-A.; Han, S.-I., Direct dynamic nuclear polarization targeting catalytically active 27 Al sites. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, 17 (38), 25449-25454.
132. Takahashi, H.; Hediger, S.; De Paëpe, G., Matrix-free dynamic nuclear polarization enables solid-state NMR 13 C–13 C correlation spectroscopy of proteins at natural isotopic abundance. *Chemical Communications* **2013**, 49 (82), 9479-9481.
133. Morterra, C.; Magnacca, G., A case study: surface chemistry and surface structure of catalytic aluminas, as studied by vibrational spectroscopy of adsorbed species. *Catalysis Today* **1996**, 27 (3-4), 497-532.
134. Zhuravlev, L., Concentration of hydroxyl groups on the surface of amorphous silicas. *Langmuir* **1987**, 3 (3), 316-318.
135. Jeffries, C., Polarization of nuclei by resonance saturation in paramagnetic crystals. *Physical Review* **1957**, 106 (1), 164.
136. Abraham, M.; Kedzie, R.; Jeffries, C., γ -Ray anisotropy of Co 60 nuclei polarized by paramagnetic resonance saturation. *Physical Review* **1957**, 106 (1), 165.
137. Kessenikh, A.; Lushchikov, V.; Manenkov, A.; Taran, Y. V., Proton polarization in irradiated polyethylenes. *Soviet Phys.-Solid State (English Transl.)* **1963**, 5.
138. Kessenikh, A.; Manenkov, A.; Pyatnitskii, G., On explanation of experimental data on dynamic polarization of protons in irradiated polyethylenes. *Soviet Phys.-Solid State (English Transl.)* **1964**, 6.
139. Hwang, C. F.; Hill, D. A., Phenomenological model for the new effect in dynamic polarization. *Physical Review Letters* **1967**, 19 (18), 1011.
140. Tan, K. O.; Yang, C.; Weber, R. T.; Mathies, G.; Griffin, R. G., Time-optimized pulsed dynamic nuclear polarization. *Science advances* **2019**, 5 (1), eaav6909.
141. Ong, T.-C.; Mak-Jurkauskas, M. L.; Walish, J. J.; Michaelis, V. K.; Corzilius, B. r.; Smith, A. A.; Clausen, A. M.; Cheetham, J. C.; Swager, T. M.; Griffin, R. G., Solvent-free dynamic nuclear polarization of amorphous and crystalline ortho-terphenyl. *The Journal of Physical Chemistry B* **2013**, 117 (10), 3040-3046.
142. Abragam, A.; Goldman, M., Principles of dynamic nuclear polarisation. *Reports on Progress in Physics* **1978**, 41 (3), 395.
143. JL, E. E. M.; Uebersfeld, J., Effet de polarisation nucléaire dans les liquides et les gazs absorbés sur les carbones. *Compte Rendus de l'Académie des Sciences* **1958**, 246 (14), 2121-2123.

-
144. Maly, T.; Cui, D.; Griffin, R. G.; Miller, A.-F., ^1H dynamic nuclear polarization based on an endogenous radical. *The Journal of Physical Chemistry B* **2012**, *116* (24), 7055-7065.
145. Wenk, P.; Kaushik, M.; Richter, D.; Vogel, M.; Suess, B.; Corzilius, B., Dynamic nuclear polarization of nucleic acid with endogenously bound manganese. *Journal of biomolecular NMR* **2015**, *63* (1), 97-109.
146. Kaushik, M.; Bahrenberg, T.; Can, T. V.; Caporini, M. A.; Silvers, R.; Heiliger, J.; Smith, A. A.; Schwalbe, H.; Griffin, R. G.; Corzilius, B., Gd (iii) and Mn (ii) complexes for dynamic nuclear polarization: small molecular chelate polarizing agents and applications with site-directed spin labeling of proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18* (39), 27205-27218.
147. Chakrabarty, T.; Goldin, N.; Feintuch, A.; Houben, L.; Leskes, M., Paramagnetic Metal-Ion Dopants as Polarization Agents for Dynamic Nuclear Polarization NMR Spectroscopy in Inorganic Solids. *ChemPhysChem* **2018**, *19* (17), 2139-2142.
148. Wolf, T.; Kumar, S.; Singh, H.; Chakrabarty, T.; Aussenac, F.; Frenkel, A. I.; Major, D. T.; Leskes, M., Endogenous dynamic nuclear polarization for natural abundance ^{17}O and lithium NMR in the bulk of inorganic solids. *Journal of the American Chemical Society* **2018**, *141* (1), 451-462.
149. Kessenikh, A.; Manenkov, A., Dynamic polarization of nuclei during saturation of nonuniformly broadened electron paramagnetic resonance lines. *Soviet Physics-Solid State* **1963**, *5* (4), 835-837.
150. Borghini, M., Spin-temperature model of nuclear dynamic polarization using free radicals. *Physical Review Letters* **1968**, *20* (9), 419.
151. Atsarkin, V.; Mefed, A.; Rodak, M., Connection of electron spin-spin interactions with polarization and nuclear spin relaxation in ruby. *Sov. Phys. JETP* **1969**, *28* (5), 877-885.
152. Wollan, D. S., Dynamic nuclear polarization with an inhomogeneously broadened ESR line. I. Theory. *Physical Review B* **1976**, *13* (9), 3671.
153. Wollan, D. S., Dynamic nuclear polarization with an inhomogeneously broadened ESR line. II. Experiment. *Physical Review B* **1976**, *13* (9), 3686.
154. Goetz, M., Photo-CIDNP spectroscopy. *Annual reports on NMR Spectroscopy* **2009**, *66*, 77-147.
155. Goetz, M., Calculation of CIDNP signal intensities. *Concepts in Magnetic Resonance* **1995**, *7* (2), 137-152.
156. Hore, J.; Broadhurst, R., Photo-CIDNP of biopolymers. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* **1993**, *25* (4), 345-402.
157. Kaptein, R.; Dijkstra, K.; Nicolay, K., Laser photo-CIDNP as a surface probe for proteins in solution. *Nature* **1978**, *274* (5668), 293-294.
158. Closs, G. L., Mechanism explaining nuclear spin polarizations in radical combination reactions. *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91* (16), 4552-4554.
159. Kaptein, R.; Oosterhoff, L. J., Chemically induced dynamic nuclear polarization III (anomalous multiplets of radical coupling and disproportionation products). *Chemical Physics Letters* **1969**, *4* (4), 214-216.
160. Salikhov, K. M.; Molin, Y. N.; Sagdeev, R.; Buchachenko, A., Spin polarization and magnetic effects in radical reactions. **1984**.
161. Rodgers, C. T.; Hore, P. J., Chemical magnetoreception in birds: the radical pair mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2009**, *106* (2), 353-360.
162. Brocklehurst, B., Magnetic fields and radical reactions: recent developments and their role in nature. *Chemical Society Reviews* **2002**, *31* (5), 301-311.
163. Steiner, U. E.; Ulrich, T., Magnetic field effects in chemical kinetics and related phenomena. *Chemical Reviews* **1989**, *89* (1), 51-147.
164. Stob, S.; Kaptein, R., Photo-CIDNP of the amino acids. *Photochemistry and photobiology* **1989**, *49* (5), 565-577.
165. Tsentalovich, Y. P.; Morozova, O. B.; Yurkovskaya, A. V.; Hore, P., Kinetics and Mechanism of the Photochemical Reaction of 2, 2'-Dipyridyl with Tryptophan in Water: Time-

Resolved CIDNP and Laser Flash Photolysis Study. *The Journal of Physical Chemistry A* **1999**, *103* (27), 5362-5368.

166. Tsentalovich, Y. P.; Morozova, O. B.; Yurkovskaya, A. V.; Hore, P.; Sagdeev, R. Z., Time-Resolved CIDNP and Laser Flash Photolysis Study of the Photoreactions of N-Acetyl Histidine with 2, 2'-Dipyridyl in Aqueous Solution. *The Journal of Physical Chemistry A* **2000**, *104* (30), 6912-6916.

167. Morozova, O. B.; Korchak, S. E.; Sagdeev, R. Z.; Yurkovskaya, A. V., Time-resolved chemically induced dynamic nuclear polarization studies of structure and reactivity of methionine radical cations in aqueous solution as a function of pH. *The Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109* (45), 10459-10466.

168. Morozova, O. B.; Yurkovskaya, A. V., Aminium cation radical of glycylglycine and its deprotonation to aminyl radical in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry B* **2008**, *112* (40), 12859-12862.

169. Morozova, O. B.; Panov, M. S.; Vieth, H.-M.; Yurkovskaya, A. V., CIDNP study of sensitized photooxidation of S-methylcysteine and S-methylglutathione in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **2016**, *321*, 90-98.

170. Stob, S.; Scheek, R.; Kaptein, R., Photo-CIDNP in guanine nucleic acid derivatives. A mechanistic study. *Photochemistry and photobiology* **1989**, *49* (6), 717-723.

171. Schleich, T.; Scheek, R.; Stob, S.; Alma, N.; Hilbers, C.; Kaptein, R., PHOTO-CIDNP STUDY OF ADENYLYL-CONTAINING DEOXY-DINUCLEOTIDES. PAIR SUBSTITUTION EFFECTS DUE TO INTRAMOLECULAR CATION RADICAL DEPROTONATION. *Photochemistry and Photobiology* **1982**, *35* (4), 575-577.

172. Scheek, R.; Stob, S.; Schleich, T.; Alma, N.; Hilbers, C.; Kaptein, R., Photo-CIDNP study of adenosine 5'-monophosphate. Pair-substitution effects due to cation radical deprotonation. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103* (19), 5930-5932.

173. Yurkovskaya, A. V.; Snytnikova, O. A.; Morozova, O. B.; Tsentalovich, Y. P.; Sagdeev, R. Z., Time-resolved CIDNP and laser flash photolysis study of the photoreaction between triplet 2, 2'-dipyridyl and guanosine-5'-monophosphate in water. *Physical chemistry chemical physics* **2003**, *5* (17), 3653-3659.

174. Saprygina, N. N.; Morozova, O. B.; Abramova, T. V.; Grampp, G. n.; Yurkovskaya, A. V., Oxidation of Purine Nucleotides by Triplet 3, 3', 4, 4'-Benzophenone Tetracarboxylic Acid in Aqueous Solution: pH-Dependence. *The Journal of Physical Chemistry A* **2014**, *118* (27), 4966-4974.

175. Morozova, O. B.; Fishman, N. N.; Yurkovskaya, A. V., Indirect NMR detection of transient guanosyl radical protonation in neutral aqueous solution. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2017**, *19* (32), 21262-21266.

176. Pouwels, P. J.; Hartman, R. F.; Rose, S. D.; Kaptein, R., CIDNP evidence for reversibility of the photosensitized splitting of pyrimidine dimers. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116* (15), 6967-6968.

177. Snytnikova, O.; Tsentalovich, Y. P.; Sagdeev, R., Laser flash photolysis and time-resolved CIDNP study of photochemical reactions between aqueous tryptophan and nucleotides. *Applied Magnetic Resonance* **2004**, *26* (1), 183-195.

178. Morozova, O. B.; Korchak, S. E.; Vieth, H.-M.; Yurkovskaya, A. V., Photo-CIDNP study of transient radicals of Met-Gly and Gly-Met peptides in aqueous solution at variable pH. *The Journal of Physical Chemistry B* **2009**, *113* (20), 7398-7406.

179. Köchling, T.; Morozova, O. B.; Yurkovskaya, A. V.; Vieth, H.-M., Magnetic resonance characterization of one-electron oxidized cyclic dipeptides with thioether groups. *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, *120* (35), 9277-9286.

180. Saprygina, N. N.; Morozova, O. B.; Grampp, G. n.; Yurkovskaya, A. V., Effect of amino group charge on the photooxidation kinetics of aromatic amino acids. *The Journal of Physical Chemistry A* **2014**, *118* (2), 339-349.

-
181. Winder, S.; Broadhurst, R.; Hore, P., Photo-CIDNP of amino acids and proteins: effects of competition for flavin triplets. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **1995**, 51 (10), 1753-1761.
182. Okuno, Y.; Cavagnero, S., Fluorescein: A photo-CIDNP sensitizer enabling hypersensitive NMR data collection in liquids at low micromolar concentration. *The Journal of Physical Chemistry B* **2016**, 120 (4), 715-723.
183. Bowers, C. R.; Weitekamp, D. P., Transformation of symmetrization order to nuclear-spin magnetization by chemical reaction and nuclear magnetic resonance. *Physical Review Letters* **1986**, 57 (21), 2645.
184. Bowers, C. R.; Weitekamp, D. P., Parahydrogen and synthesis allow dramatically enhanced nuclear alignment. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, 109 (18), 5541-5542.
185. Eisenschmid, T. C.; Kirss, R. U.; Deutsch, P. P.; Hommeltoft, S. I.; Eisenberg, R.; Bargon, J.; Lawler, R. G.; Balch, A. L., Para hydrogen induced polarization in hydrogenation reactions. *Journal of the American Chemical Society* **1987**, 109 (26), 8089-8091.
186. Bhattacharya, P.; Harris, K.; Lin, A.; Mansson, M.; Norton, V. A.; Perman, W.; Weitekamp, D. P.; Ross, B. D., Ultra-fast three dimensional imaging of hyperpolarized ^{13}C in vivo. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine* **2005**, 18 (5), 245-256.
187. Bhattacharya, P.; Chekmenev, E. Y.; Perman, W. H.; Harris, K. C.; Lin, A. P.; Norton, V. A.; Tan, C. T.; Ross, B. D.; Weitekamp, D. P., Towards hyperpolarized ^{13}C -succinate imaging of brain cancer. *Journal of magnetic resonance* **2007**, 186 (1), 150-155.
188. Kovtunov, K. V.; Zhivonitko, V. V.; Corma, A.; Koptug, I. V., Parahydrogen-induced polarization in heterogeneous hydrogenations catalyzed by an immobilized Au (III) complex. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2010**, 1 (11), 1705-1708.
189. Green, R.; Adams, R.; Duckett, S.; Mewis, R.; Williamson, D.; Green, G., Prog Nucl Magn Reson Spectrosc. 2012.
190. Zinieris, N.; Leondiadis, L.; Ferderigos, N., Nalpha-Fmoc removal from resin-bound amino acids by 5% piperidine solution. *Journal of combinatorial chemistry* **2005**, 7 (1), 4-6.
191. Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G., Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. *Molecular biotechnology* **2006**, 33 (3), 239-254.
192. Behrendt, R.; White, P.; Offer, J., Advances in Fmoc solid-phase peptide synthesis. *Journal of Peptide Science* **2016**, 22 (1), 4-27.
193. Luna, O. F.; Gomez, J.; Cárdenas, C.; Albericio, F.; Marshall, S. H.; Guzmán, F., Deprotection reagents in Fmoc solid phase peptide synthesis: moving away from piperidine? *Molecules* **2016**, 21 (11), 1542.
194. Vergel Galeano, C. F.; Rivera Monroy, Z. J.; Rosas Pérez, J. E.; García Castañeda, J. E., Efficient synthesis of peptides with 4-methylpiperidine as Fmoc removal reagent by solid phase synthesis. *Journal of the Mexican Chemical Society* **2014**, 58 (4), 386-392.
195. McDowall, L.; Stenzel, M. H., Disulfide bridge based conjugation of peptides to RAFT polymers. *Polymer Chemistry* **2014**, 5 (5), 1772-1781.
196. Thierry, J.; Yue, C.; Potier, P., 2-Phenyl isopropyl and t-butyl trichloroacetimidates: Useful reagents for ester preparation of N-protected amino acids under neutral conditions. *Tetrahedron letters* **1998**, 39 (12), 1557-1560.
197. Herr, K. Synthese und Immobilisierung Radikal markierter Peptide. Master Thesis, TU Darmstadt, Darmstadt, 2018.
198. Ikeda, A.; Terada, K.; Shiotsuki, M.; Sanda, F., Synthesis of polymers bearing proline moieties in the side chains and their application as catalysts for asymmetric induction. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **2011**, 49 (17), 3783-3796.
199. Koivisto, J. J.; Kumpulainen, E. T.; Koskinen, A. M., Conformational ensembles of flexible β -turn mimetics in DMSO- d_6 . *Organic & biomolecular chemistry* **2010**, 8 (9), 2103-2116.
200. Biemann, K.; Martin, S. A., Mass spectrometric determination of the amino acid sequence of peptides and proteins. *Mass Spectrometry Reviews* **1987**, 6 (1), 1-75.
-

201. Iwahashi, H.; Parker, C. E.; Mason, R. P.; Tomer, K. B., Combined liquid chromatography/electron paramagnetic resonance spectrometry/electrospray ionization mass spectrometry for radical identification. *Analytical chemistry* **1992**, *64* (19), 2244-2252.
202. Brodrecht, M.; Herr, K.; Bothe, S.; de Oliveira Jr, M.; Gutmann, T.; Buntkowsky, G., Efficient Building Blocks for Solid-Phase Peptide Synthesis of Spin Labeled Peptides for Electron Paramagnetic Resonance and Dynamic Nuclear Polarization Applications. *ChemPhysChem* **2019**, *20* (11), 1475-1487.
203. Uzagare, M. C.; Claußnitzer, I.; Gerrits, M.; Bannwarth, W., Site specific chemoselective labelling of proteins with robust and highly sensitive Ru (II) bathophenanthroline complexes. *Organic & biomolecular chemistry* **2012**, *10* (11), 2223-2226.
204. Kiesewetter, M. K.; Corzilius, B. r.; Smith, A. A.; Griffin, R. G.; Swager, T. M., Dynamic nuclear polarization with a water-soluble rigid biradical. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (10), 4537-4540.
205. Geiger, M. A.; Jagtap, A. P.; Kaushik, M.; Sun, H.; Stöppler, D.; Sigurdsson, S. T.; Corzilius, B.; Oschkinat, H., Efficiency of Water-Soluble Nitroxide Biradicals for Dynamic Nuclear Polarization in Rotating Solids at 9.4 T: bcTol-M and cyolyl-TOTAPOL as New Polarizing Agents. *Chemistry—A European Journal* **2018**, *24* (51), 13485-13494.
206. Corzilius, B.; Andreas, L. B.; Smith, A. A.; Ni, Q. Z.; Griffin, R. G., Paramagnet induced signal quenching in MAS-DNP experiments in frozen homogeneous solutions. *Journal of Magnetic Resonance* **2014**, *240*, 113-123.
207. Mentink-Vigier, F.; Paul, S.; Lee, D.; Feintuch, A.; Hediger, S.; Vega, S.; De Paëpe, G., Nuclear depolarization and absolute sensitivity in magic-angle spinning cross effect dynamic nuclear polarization. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2015**, *17* (34), 21824-21836.
208. Rogawski, R.; Sergeyev, I. V.; Zhang, Y.; Tran, T. H.; Li, Y.; Tong, L.; McDermott, A. E., NMR signal quenching from bound biradical affinity reagents in DNP samples. *The Journal of Physical Chemistry B* **2017**, *121* (48), 10770-10781.
209. Kinoshita, Y.; Yamada, K.-I.; Yamasaki, T.; Sadasue, H.; Sakai, K.; Utsumi, H., Development of novel nitroxyl radicals for controlling reactivity with ascorbic acid. *Free radical research* **2009**, *43* (6), 565-571.
210. Borch, R. F.; Bernstein, M. D.; Durst, H. D., Cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *Journal of the American Chemical Society* **1971**, *93* (12), 2897-2904.
211. Borch, R. F.; Hassid, A. I., New method for the methylation of amines. *The Journal of Organic Chemistry* **1972**, *37* (10), 1673-1674.
212. Herr, K.; Fleckenstein, M.; Brodrecht, M.; Höfler, M. V.; Heise, H.; Aussenac, F.; Gutmann, T.; Reggelin, M.; Buntkowsky, G., A novel strategy for site selective spin-labeling to investigate bioactive entities by DNP and EPR spectroscopy. *Scientific Reports* **2021**, *11* (1), 1-12.
213. Hashemzadeh, M.; Furukawa, M.; Goldsberry, S.; Movahed, M. R., Chemical structures and mode of action of intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor blockers: A review. *Experimental and clinical cardiology* **2008**, *13* (4), 192-197.
214. Schror, K.; Weber, A. A., Comparative pharmacology of GP IIb/IIIa antagonists. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* **2003**, *15* (2), 71-80.
215. Tymoczko, J. L.; Berg, J. M.; Stryer, L., *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company: 2012.
216. Ellman, G., Tissue sulphydryl groups *Arch Biochem Biophys* **82**: 70–77. **1959**.
217. Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B., Ellman's reagent: 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)—a reexamination. *Analytical biochemistry* **1979**, *94* (1), 75-81.
218. Riddles, P. W.; Blakeley, R. L.; Zerner, B., [8] Reassessment of Ellman's reagent. *Methods in enzymology* **1983**, *91*, 49-60.
219. de Oliveira Jr, M.; Herr, K.; Brodrecht, M.; Haro-Mares, N. B.; Wissel, T.; Klimavičius, V.; Breitzke, H.; Gutmann, T.; Buntkowsky, G., Solvent-free dynamic nuclear polarization enhancements in organically modified mesoporous silica. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2021**.

-
220. Jagtap, A. P.; Krstic, I.; Kunjir, N. C.; Hänsel, R.; Prisner, T. F.; Sigurdsson, S. T., Sterically shielded spin labels for in-cell EPR spectroscopy: Analysis of stability in reducing environment. *Free Radical Research* **2015**, 49 (1), 78-85.
221. Gilchrist, I. C., Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors in Percutaneous Coronary Intervention. *Clinical pharmacokinetics* **2003**, 42 (8), 703-720.
222. Stevens, M.; McKay, J. E.; Robinson, J.; Mkami, H. E.; Smith, G. M.; Norman, D., The use of the Rx spin label in orientation measurement on proteins, by EPR. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, 18 (8), 5799-5806.
223. Fung, B.; Khitrin, A.; Ermolaev, K., An improved broadband decoupling sequence for liquid crystals and solids. *Journal of magnetic resonance* **2000**, 142 (1), 97-101.
224. Knerr, P. J.; Van Der Donk, W. A., Chemical synthesis and biological activity of analogues of the lantibiotic epilancin 15X. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134 (18), 7648-7651.
225. Heuckendorff, M.; Jensen, H. H., Removal of some common glycosylation by-products during reaction work-up. *Carbohydrate Research* **2017**, 439, 50-56.
226. Sauvée, C.; Rosay, M.; Casano, G.; Aussenac, F.; Weber, R. T.; Ouari, O.; Tordo, P., Highly efficient, water-soluble polarizing agents for dynamic nuclear polarization at high frequency. *Angewandte Chemie* **2013**, 125 (41), 11058-11061.
227. Wang, T.; Wu, Y.; Kuan, S. L.; Dumele, O.; Lamla, M.; Ng, D. Y.; Arzt, M.; Thomas, J.; Mueller, J. O.; Barner-Kowollik, C., A Disulfide Intercalator Toolbox for the Site-Directed Modification of Polypeptides. *Chemistry—A European Journal* **2015**, 21 (1), 228-238.



Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Chemische Struktur von TOAC 1 , L-Ser(Propargyl)-OH 2 und 4-Benzoyl-L-phenylalanin 3	4
Abbildung 3-1: Aufspaltung des Energieniveaus eines Elektronenspins erzeugt durch ein angelegtes magnetisches Feld. ²⁰	10
Abbildung 3-2: Simuliertes ESR-Spektrum mit exemplarischer Hyperfein-Kopplung am Beispiel eines Methylradikals [$\cdot\text{CH}_3$] mit der Anzahl der Linien = $2NS + 1 = 2 \cdot 3 \cdot 12 + 1 = 4$. ²⁰	12
Abbildung 3-3: Darstellung der Funktionalitätsstruktur auf dem Trägermaterial Polystyrol (PS) des 2-Chlorotrityl-Harzes.....	21
Abbildung 3-4: Darstellung der linearen Regression bekannter Dibenzofulven-Piperidin-Addukt-Konzentrationen bei 301 nm zur Bestimmung des molaren Absorptionskoeffizienten.	24
Abbildung 4-1: Allgemeiner Strukturvorschlag eines markierten Fmoc-Aminosäurebausteins zur Verwendung in der SPPS.....	25
Abbildung 5-1: ESR-Spektren der finalen PROXYL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren Hyp 23 , Ser 25 , Tyr 26 und PROXYL bei 298 K. (a) Darstellung aller Spektren mit Normierung auf ihre maximale Intensität. (b) Darstellung der Spektren mit ihrer originalen Intensität ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in TCE (Tetrachlorethan) betrug.	36
Abbildung 5-2: ESR-Spektren von a) TOTAPOL 27 (schwarz) und b) TOTAPOL funktionalisiertes Fmoc-Glu-OH 33 . (rot). Spektren wurden auf die maximale Intensität normalisiert. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch. Die Proben wurden in einer Konzentration von 15 mM in DMSO bei 293 K gemessen.	42
Abbildung 6-1: Darstellung der gewählten Peptid-Sequenz 37 zur Untersuchung der Radikal-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure 23 . Rote Atome stellen die vier möglichen Funktionalisierungspositionen dar.....	48
Abbildung 6-2: Modell-Peptidsequenz zur Bestimmung der Abstände zwischen Prolin-1 und Prolin-4.	48
Abbildung 6-3: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL 8 und der Radikal-funktionalisierten Radikalpeptide 38-44 bei 298 K. (a) Darstellung aller Spektren ohne Normierung der Monoradikalpeptide 35-38 (rot) und Biradikalpeptide 38-44 (blau). (b) Darstellung der Spektren mit ihrer Intensität im direkten Vergleich. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration der Peptid-Radikallösungen jeweils 5 mM in H ₂ O betrug und bei 3-Carboxy-PROXYL 8 ebenfalls 5 mM jedoch in H ₂ O/MeCN 1/1 (v/v).....	51
Abbildung 6-4: ¹ H- (a) und ¹ H→ ¹³ C-CP-MAS-NMR-Spektren (b) von 15 mM des Peptidradikals 40 in einer Glycerin-d ₈ /D ₂ O/H ₂ O-Matrix mit (MW on) und ohne (MW off)	

Mikrowellenbestrahlung, gemessen bei 9,4 Tesla mit 8 kHz Spinnrate. In den ^{13}C -Spektren beziehen sich die beiden Signale bei 60,7 ppm und 70,5 ppm auf das Glycerin, wobei das mit # bezeichnete Signal bei 0 ppm dem Siliziumstopfen zuzuordnen ist, der zum Einschluss der Flüssigkeit im NMR-Rotor verwendet wird. Die Sternchen markieren die Rotationsseitenbanden des Glycerins in den ^{13}C -Spektren und die Rotationsseitenbanden des Wassers in den ^1H -Spektren. 52

Abbildung 6-5: ^1H - (a) und $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ -CP-MAS-NMR-Spektren (b) von 15 mM des Peptidradikals **44** in einer Glycerin- $\text{d}_8/\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ -Matrix mit (MW on) und ohne (MW off) Mikrowellenbestrahlung, gemessen bei 9,4 Tesla mit 8 kHz Spinnrate. Hierbei wurde das ^1H -Spektrum ohne Mikrowellenbestrahlung in (a) mit dreifacher Vergrößerung dargestellt. In den ^{13}C -Spektren beziehen sich die beiden Signale bei 60,7 ppm und 70,5 ppm auf das Glycerin, wobei das mit # bezeichnete Signal bei 0 ppm dem Siliziumstopfen zuzuordnen ist, der zum Einschluss der Flüssigkeit im NMR-Rotor verwendet wird. Die Sternchen markieren die Rotationsseitenbanden des Glycerins in den ^{13}C -Spektren und die Rotationsseitenbanden des Wassers in den ^1H -Spektren. 52

Abbildung 6-6: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und dem Biradikalpeptid **43** bei 298 K. Darstellung aller Spektren ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in H_2O betrug und der pH-Wert auf 9 mittels Ammoniaklösung ($\text{NH}_3(\text{aq})$) eingestellt wurde..... 54

Abbildung 6-7: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und dem Biradikalpeptid **43** bei 298 K. Darstellung aller Spektren ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in H_2O betrug und **43** mit unterschiedlichen Volumina an 1 M Natriumhydroxid (NaOH) versetzt wurde..... 55

Abbildung 6-8: HPLC-Chromatogramm von **43** in unterschiedlichen Volumenprozent an 1M Natriumhydroxid (NaOH). 55

Abbildung 6-9: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und dem Biradikalpeptid **43** bei 298 K. Darstellung aller Spektren ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in verschiedenen wässrigen pH-Puffern betrug. 56

Abbildung 6-10: HPLC-Chromatogramme des Biradikalpeptid **43** in unterschiedlichen pH-Puffern gelöst. 57

Abbildung 6-11: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und dem Biradikalpeptid **43** bei 298 K. Darstellung aller Spektren ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in TCE (Tetrachlorethan) betrug und **43** mit 400 Äquivalenten Diisopropylethylamin **6** (DIPEA) versetzt wurde..... 57

Abbildung 6-12: ESR-Spektren von 3-Carboxy-PROXYL **8** und dem Biradikalpeptid **43** bei 298 K. Darstellung aller Spektren ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 15 mM in TCE (Tetrachlorethan) betrug und **43** mit unterschiedlichen Volumina an Triethylamin versetzt wurde..... 58

- Abbildung 6-13:** ESR-Spektren der reproduzierten, funktionalisierten Radikalpeptide **42**, **43**, **44** und 3-Carboxy-PROXYL **8** bei 298 K. (a) Darstellung aller Spektren mit Normierung auf ihre maximale Intensität. (b) Darstellung der Spektren mit ihrer ursprünglichen Intensität ohne Normierung. Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch, wobei die Konzentration 5 mM in H₂O betrug. 60
- Abbildung 6-14:** Darstellung der Strukturen der aktiven Radikal-funktionalisierten Peptide. Das Monoradikal **40** und das Biradikal **44**. 62
- Abbildung 6-15:** Darstellung der Tetrapeptid-Verbindung NH₂-His-Glu(NH-Benzophenon)-Tyr-Gly-OH **45** und deren Referenzpeptid ohne Funktionalisierung **46**. 63
- Abbildung 7-1:** Retrosynthetische Darstellung der Biradikale PYPol **49** und AMUPol **48** und ihrer Dispiro-Radikal-Synthesestufe **47**. 65
- Abbildung 8-1:** Darstellung der HPLC-Signale des Interkalationsprozesses bei 214 nm, mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA über 20 Minuten (a) Eptifibatid **54**, (b) reduziertes Eptifibatid **61**, (c) Radikal-markiertes Eptifibatid **62**, (d) Mischung der Radikal-Markierungen **57** und **58**. [Herr, 2021 #492] 70
- Abbildung 8-2:** a) Absorptionen bekannter Konzentrationen von Dithiothreitol **63** (DTT) und markiertem Eptifibatid **62** nach Reduktionsreaktion mit Ellmans-Reagenz (DTNB). b) Kalibriergerade durch lineare Regression der gemessenen Absorptionen der bekannten Konzentrationen von DTT nach der Reduktionsreaktion mit Ellmans-Reagenz (DTNB). Die Auswertung erfolgte für das Absorptionsmaximum bei 412 nm. [Herr, 2021 #492]. 72
- Abbildung 8-3:** ESR-Spektren von a) Radikal-markiertem Eptifibatid **62** (blau), b) einer Mischung der Radikal-Markierungen **57** und **58** (orange) und c) von TEMPO als Referenz (schwarz). Spektren normalisiert auf die maximale Intensität (links). Spektren mit Originalintensität ohne Normalisierung (rechts). Die experimentellen Bedingungen waren für alle Proben identisch. Die Proben wurden bei Konzentrationen von 1 mM in DMSO bei 293 K gemessen. [Herr, 2021 #492] 73
- Abbildung 8-4:** ¹H- (a) und ¹H→¹³C-CP-MAS-NMR-Spektren (b) von 15 mM Radikal-markierten Eptifibatid **62** in einer Glycerin-d₈/D₂O/H₂O-Matrix mit (MW on) und ohne (MW off) Mikrowellenbestrahlung, gemessen bei 9,4 Tesla mit 8 kHz Spinnrate. Hinweis: In den ¹³C-Spektren beziehen sich die beiden Signale bei 60,7 ppm und 70,5 ppm auf das Glycerin. Die mit # gekennzeichneten Signale bei 0 ppm sind den Methylkohlenstoffen des Siliconstopfens zuzuordnen, welcher zum Einschluss der Flüssigkeit im NMR-Rotor verwendet wurde. Die Sternchen zeigen die Spinning-Seitenbänder des Glycerins in den ¹³C-Spektren und die Spinning-Seitenbänder des Wassers in den ¹H-Spektren. [Herr, 2021 #492] 74
- Abbildung 8-5:** Darstellung der HPLC-Signale des Interkalationsprozesses bei 214 nm, mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA über 20 Minuten (a) Eptifibatid **54**, (b) reduziertes Eptifibatid **61**, (c) PHIP markiertes Eptifibatid **68**, (d) Mischung der Allyl-Markierungen **59** und **60**. 76
- Abbildung 8-6:** a) ¹HNMR-Spektrum bei 300 MHz von **68** und Rh(dppb)(COD)BF₄ in Methanol-d₄ (Hintergrundspektrum mit 64 Scans). b) 10s nach Beginn der Hydrierung mit Parawasserstoff angereicherten Wasserstoffgas (PHIP-Spektrum mit 1 Scan, 500-fach

vergrößert). c) 60 s nach Hydrierung mit Parawasserstoff angereicherten Wasserstoffgas (Relaxiertes Spektrum, 4096 Scans).....	77
Abbildung 12-1: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-O ^t Butyl 15 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	127
Abbildung 12-2: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-O ^t Butyl 15	127
Abbildung 12-3: ¹ H-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-O ^t Butyl 15	128
Abbildung 12-4: ¹³ C-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Hyp(OH)-O ^t Butyl 15	128
Abbildung 12-5: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Serin(OH)-O ^t Butyl 16 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	129
Abbildung 12-6: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Serin(OH)-O ^t Butyl 16	129
Abbildung 12-7: ¹ H-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Serin(OH)-O ^t Butyl 16	130
Abbildung 12-8: ¹³ C-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Serin(OH)-O ^t Butyl 16	130
Abbildung 12-9: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Tyrosin(OH)-O ^t Butyl 17 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	131
Abbildung 12-10: ESI-MS und Zoom von Fmoc-NH-L-Tyrosin(OH)-O ^t Butyl 17	131
Abbildung 12-11: ¹ H-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Tyrosin(OH)-O ^t Butyl 17	132
Abbildung 12-12: ¹³ C-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Tyrosin(OH)-O ^t Butyl 17	132
Abbildung 12-13: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-O ^t Bu 21 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	133
Abbildung 12-14: ESI-MS und Zoom von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-O ^t Bu 21	133
Abbildung 12-15: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-O ^t Bu 22 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	133
Abbildung 12-16: ESI-MS und Zoom von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PROXYL)-O ^t Bu 22	134
Abbildung 12-17: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PROXYL)-O ^t Bu 23 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	134

Abbildung 12-18: ESI-MS und Zoom von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PROXYL)-O'Bu 23	134
Abbildung 12-19: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PRX)-OH 23 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	135
Abbildung 12-20: ESI-MS und Zoom von Fmoc-NH-L-Hyp(O-PRX)-OH 23	135
Abbildung 12-21: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Ser(O-PRX)-OH 25 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	135
Abbildung 12-22: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Ser(O-PRX)-OH 25	136
Abbildung 12-23: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PRX)-OH 26 bei 301 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	136
Abbildung 12-24: ESI-MS-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Tyr(O-PRX)-OH 26	136
Abbildung 12-25: HPLC-Chromatogramm von HO-TOTAPOL-N-Boc 29 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	137
Abbildung 12-26: ESI-MS von HO-TOTAPOL-N-Boc 29	137
Abbildung 12-27: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Glu(O-Totapol-N-Boc)-O'Bu 32 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	137
Abbildung 12-28: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Glu(O-Totapol-N-Boc)-O'Bu 32	138
Abbildung 12-29: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL)-OH 72	138
Abbildung 12-30: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL-N-Boc)-OH 33 bei 214 nm.	138
Abbildung 12-31: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Glu(O-TOTAPOL-N-Boc)-OH 33	139
Abbildung 12-32: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-O'Bu 35 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	139
Abbildung 12-33: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-O'Bu 35	139
Abbildung 12-34: HPLC-Chromatogramm von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH 36 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 %	

TFA für 10 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 5 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	140
Abbildung 12-35: ESI-MS von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH 36	140
Abbildung 12-36: ¹ H-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH 36	141
Abbildung 12-37: ¹³ C-NMR-Spektrum von Fmoc-NH-L-Glu(NH-Benzophenon)-OH 36	141
Abbildung 12-38: HPLC-Chromatogramm von HN-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 71 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	142
Abbildung 12-39: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von HN-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 71	142
Abbildung 12-40: HPLC-Chromatogramm von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 37 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	142
Abbildung 12-41: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 37	143
Abbildung 12-42: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 38 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	143
Abbildung 12-43: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 38	144
Abbildung 12-44: HPLC-Chromatogramm von Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 39 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	144
Abbildung 12-45: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 39	144
Abbildung 12-46: HPLC-Chromatogramm von Acetyl-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 40 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	145
Abbildung 12-47: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 40	145
Abbildung 12-48: HPLC-Chromatogramm von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 41 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	146

Abbildung 12-49: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von Acetyl-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 41	146
Abbildung 12-50: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	146
Abbildung 12-51: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42	147
Abbildung 12-52: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 43 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	147
Abbildung 12-53: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 43	148
Abbildung 12-54: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	148
Abbildung 12-55: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44	148
Abbildung 12-56: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	149
Abbildung 12-57: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp-Ser-Hyp-Lys-Gly 42	149
Abbildung 12-58: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp(PROXYL)-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 43 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	150
Abbildung 12-59: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp(PROXYL)-Ser-Hyp-Lys-Gly 43	150
Abbildung 12-60: HPLC-Chromatogramm von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	150
Abbildung 12-61: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von PROXYL-Hyp-Pro-Hyp-Ser-Hyp(PROXYL)-Lys-Gly 44	151

Abbildung 12-62: HPLC-Chromatogramm von NH-His-Glu(Benzopenon)-Tyr-Gly-OH 45 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	151
Abbildung 12-63: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von NH-His-Glu(Benzopenon)-Tyr-Gly-OH 45	151
Abbildung 12-64: HPLC-Chromatogramm von NH-His-Glu-Tyr-Gly-OH 46 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	152
Abbildung 12-65: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs von NH-His-Glu-Tyr-Gly-OH 46	152
Abbildung 12-66: ESI-MS von 3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 51	153
Abbildung 12-67: ¹ H-NMR-Spektrum von 3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 51	153
Abbildung 12-68: ¹³ C-NMR-Spektrum von 3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 51	154
Abbildung 12-69: ESI-MS von 7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan-15-on 52	154
Abbildung 12-70: ESI-MS von 15-amino-7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan 47	155
Abbildung 12-71: ESR-Spektrum von 15-amino-7-nitroxyl-3,11-dioxa-7-azadispiro[5.1.5.3]hexadecan 47 und 3-Carboxy-PROXYL 8 bei 298 K in Acetonitril mit einer Konzentration von 15 mM.	155
Abbildung 12-72: ¹ H-NMR-Spektrum von Bisthioether 55	156
Abbildung 12-73: ¹³ C-NMR-Spektrum von Bisthioether 55	156
Abbildung 12-74: ¹ H-NMR-Spektrum von Bissulfon 56	157
Abbildung 12-75: ¹³ C-NMR-Spektrum von Bissulfon 56	157
Abbildung 12-76: HPLC-Chromatogramm der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung 57 und 58 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	158
Abbildung 12-77: HPLC-ESI-MS der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung 57 und 58 bei 180-400 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 90 % mit 0,1 % Ameisensäure für 20 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	158
Abbildung 12-78: ¹ H-NMR-Spektrum der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung 57 und 58	159

Abbildung 12-79: ^{13}C -NMR-Spektrum der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung 57 und 58	159
Abbildung 12-80: HPLC-Chromatogramm der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung 59 und 60 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	160
Abbildung 12-81: HPLC-ESI-MS der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung 59 und 60 bei 180-400 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 90 % mit 0,1 % Ameisensäure für 20 Minuten bei einer Flussrate von 2 mL/min.....	160
Abbildung 12-82: ^1H -NMR-Spektrum der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung 59 und 60	161
Abbildung 12-83: ^{13}C -NMR-Spektrum der Bissulfon-basierten Allyl-Markierung 59 und 60	161
Abbildung 12-84: HPLC-Chromatogramm des reduzierten Eptifibatid 61 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 0 % bis 50 % mit 0,1 % TFA für 25 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	162
Abbildung 12-85: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs des reduzierten Eptifibatid 61	162
Abbildung 12-86: HPLC-Chromatogramm des Radikal-markierten Eptifibatid 62 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 20 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	163
Abbildung 12-87: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs des Radikal-markierten Eptifibatid 62	163
Abbildung 12-88: HPLC-Chromatogramm des Allyl-markierten Eptifibatid 68 bei 214 nm mit einem Gradienten von Acetonitril in Wasser von 20 % bis 80 % mit 0,1 % TFA für 20 Minuten bei einer Flussrate von 1 mL/min. Anschließend wurde für 10 Minuten mit 95 % Acetonitril in Wasser mit 0,1 % TFA gespült.	163
Abbildung 12-89: ESI-MS und Vergrößerung des Bereichs des Allyl-markierten Eptifibatid 68	164



Tabellenverzeichnis

Tabelle 5-1: Auflistung der detektierten Retentionszeiten mit prozentualem Anteil und MS-Daten der <i>tert</i> -Butyl-geschützten Fmoc-Aminosäuren und ihrer Nebenprodukte mit der jeweiligen Zuordnung.	31
Tabelle 5-2: Retentionszeiten mit prozentualem Anteil und MS-Daten der mit PROXYL funktionalisierten C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäuren.....	34
Tabelle 5-3: Retentionszeiten, Reinheiten und MS-Daten der mit PROXYL funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren.....	35
Tabelle 5-4: Retentionszeiten mit prozentualem Anteil und MS-Daten des Boc-funktionalisierten TOTAPOL 29	39
Tabelle 5-5: Retentionszeiten mit prozentualem Anteil und MS-Daten der TOTAPOL-funktionalisierten C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure 32	40
Tabelle 5-6: Retentionszeiten, Reinheiten und MS-Daten der TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure 33	41
Tabelle 5-7: Retentionszeiten mit prozentualem Anteil und MS-Daten der Benzophenon-funktionalisierten C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure 35	44
Tabelle 5-8: Retentionszeiten, Reinheiten und MS-Daten der Benzophenon funktionalisierten Fmoc-Aminosäure 36	45
Tabelle 6-1: Auflistung der Ausbeuten in Prozent und der Reinheiten (HPLC) der mit PROXYL funktionalisierten Radikal-Peptide.....	49
Tabelle 6-2: Retentionszeiten und MS-Daten der mit PROXYL funktionalisierten Radikal-Peptide.....	50
Tabelle 6-3: Auflistung der absoluten Integrale (333 bis 340 mT) der ESR-Spektren der Radikalpeptide 38-44 und des Referenz-Monoradikals 8 mit prozentualem Anteil an aktiven Radikalen im Vergleich zum Referenz-Monoradikal 8	51
Tabelle 6-4: Auflistung der Ausbeuten in Prozent und der Reinheiten (HPLC) der reproduzierten mit PROXYL funktionalisierten Bi-Radikal-Peptide 42-44	59
Tabelle 6-5: Retentionszeiten und MS-Daten der reproduzierten, mit PROXYL funktionalisierten Bi-Radikal-Peptide 42-44	60
Tabelle 6-6: Auflistung der absoluten Integrale (333 bis 340 mT) der ESR-Spektren der Radikalpeptide 42-44 und des Referenz-Monoradikals 8 mit prozentualem Anteil an aktiven Radikalen im Vergleich zum Referenz-Monoradikal 8	61
Tabelle 6-7: Auflistung der Ausbeuten in Prozent und der Reinheiten (HPLC) in Prozent des mit Benzophenon funktionalisierten Peptides 45 und dessen unfunktionalisierten Referenzpeptides 46	63

Tabelle 6-8: Retentionszeiten und MS-Daten des mit Benzophenon funktionalisierten Peptides und dessen unfunktionalisierten Referenzpeptides.....	64
Tabelle 8-1: Ergebnisse der Thiolkonzentration von 18 μ M Radikal-markierten Eptifibatid 62 unter Verwendung der Kalibriergeraden bekannter Konzentrationen von DTT 63 und unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten von TNB 66 gemäß der Literatur. ²¹⁵⁻²¹⁷	72
Tabelle 11-1: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 69 .	102
Tabelle 11-2: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 37 .	103
Tabelle 11-3: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 38 .	104
Tabelle 11-4: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 39 .	105
Tabelle 11-5: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 42 .	106
Tabelle 11-6: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 70 .	107
Tabelle 11-7: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 41 .	108
Tabelle 11-8: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 44 .	109
Tabelle 11-9: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 40 .	110
Tabelle 11-10: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 43 .	112
Tabelle 11-11: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 42 .	113
Tabelle 11-12: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 43 .	114
Tabelle 11-13: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 44 .	115
Tabelle 11-14: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 45 .	116
Tabelle 11-15: Auflistung der Einwaagen der einzelnen Kopplungen zur Synthese von 46 .	117

Verzeichnis der Schemata

Schema 2-1: Beispiel der Spinmarkierung eines hypothetischen Biosystems durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen einer freien Thiolgruppe im Peptid mit einem Methanthiosulfonat-funktionalisierten Radikal 4 (<i>S</i> -(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-2,5-dihydro-1H-pyrrol-3-yl)methyl methansulfonothioat, MTSL).....	5
Schema 2-2: Lösungsmittel-unterstützte Thiol-Maleimid-Kopplung einer möglichen Markierung eines Peptides mit Thiol-Funktionalität.....	5
Schema 2-3: Allgemeine Darstellung einer Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Kopplung zur Markierung von Peptiden. ⁶⁷	6
Schema 3-1: Allgemeine Darstellung einer zyklischen photochemischen Reaktion zwischen Farbstoff (D) und Quencher (Q), bei der CIDNP erzeugt werden kann. Nach Photoanregung und Interkonversion mit anschließendem Elektronentransfer wird aus dem Triplett-Vorläufer (³ D*) ein Radikalpaar im Triplett-Zustand gebildet. Die <i>Inter-System-Crossing</i> (ISC)-induzierten Triplett-Singulett-Übergänge im Radikalpaar; rekombinieren das Singulett-Radikalpaar in den Grundzustand (<i>termination</i>). Die CIDNP-Bildung wird durch die Abhängigkeit der Interkonversionsrate vom Kernspinzustand des Radikalpaares verursacht. Daher ist das Reaktionsprodukt in bestimmten Kernspinzuständen angereichert. ¹³	18
Schema 3-2: Allgemeine Darstellung von Parawasserstoff-basierter Hyperpolarisation mit Polarisationstransfer durch die grundlegenden Reaktionen der Hydrierung einer Dreifachbindung a) und einer Doppelbindung b).	20
Schema 3-3: Allgemeiner Reaktionsverlauf einer SPPS.	22
Schema 3-4: Ein allgemeines Schema der HATU-vermittelten Bildung eines Aktivesters zum Wachstum einer Peptidkette der SPPS.	23
Schema 3-5: Mechanismus der Entfernung der Fmoc-Gruppe vom festen Träger und Bildung des Dibenzofulvene-Piperidin-Addukts in Gegenwart von Piperidin.	23
Schema 4-1: Vorschlag eines allgemeinen Reaktionsverlaufs der SPPS mit einer markierten Fmoc-Aminosäure (BS ₂).	26
Schema 4-2: Allgemeine Darstellung der Einführung der Bissulfon-basierten Markierung in die reduzierte Disulfidbindung eines Biomoleküls.	27
Schema 5-1: Allgemeines Syntheschema Seitenketten-markierter Fmoc-Aminosäuren und ihr Einbau in Peptide mittels Festphasen-Peptidsynthese (SPPS). Dargestellt sind die Reaktionsschritte der C-terminalen Schützung, der Funktionalisierung der Seitenkette (SK) und der C-terminalen Entschützung mit anschließendem Einsatz in der SPPS.	29
Schema 5-2: Allgemeine Darstellung der Synthese von Radikal-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren. Dargestellt sind die Reaktionsschritte der C-terminalen Schützung, der Funktionalisierung der Seitenkette mit dem Nitroxyl-Radikal 3-Carboxy-PROXYL 8 und der C-terminalen Entschützung.	30

Schema 5-3: C-terminale Schützung von Fmoc-Hydroxyprolin 12 , Fmoc-Serin 13 und Fmoc-Tyrosin 14 mittels <i>tert</i> -Butyl-2,2,2-trichloroacetimidat 7 mit Reaktionsbedingungen.	31
Schema 5-4: Darstellung der Arbeitsschritte der Schützungsreaktion aus vorigen Arbeiten (I) ¹⁹⁷ im Vergleich zu der aktuellen und optimierten Reaktion (II) exemplarisch für das Edukt Fmoc-Hydroxyprolin 12 mit ihren jeweiligen Ausbeuten, Reinheiten und Reaktionszeiten.	32
Schema 5-5: Radikal-Funktionalisierung der reaktiven Hydroxy-Seitenkette der C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäuren 15 , 16 und 17 mit 3-Carboxy-PROXYL 8 mittels EDC 19 und DMAP 20	33
Schema 5-6: Entschützung des C-Terminus der PROXYL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren 21 , 22 und 23	35
Schema 5-7: Darstellung der Edukte und Produkte der Radikal-Markierung. Die Fmoc-Aminosäuren Hydroxyprolin 12 , Serin 13 und Tyrosin 14 werden zu den PROXYL funktionalisierten Fmoc-Aminosäuren 23 , 25 und 26 umgesetzt.	37
Schema 5-8: Allgemeine Darstellung der Synthese einer TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure. Dargestellt sind die Reaktionsschritte der Boc-Schützung von TOTAPOL 27 , die Funktionalisierung der Seitenkette mit HO-TOTAPOL- <i>N</i> -Boc 29 und die C-terminale Entschützung mit anschließender erneuter Boc-Schützung.	38
Schema 5-9: Darstellung der Boc-Schützung des sekundären Amins von TOTAPOL 27	39
Schema 5-10: TOTAPOL-Funktionalisierung der Carboxy-Seitenkette der C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure 31 durch 29 mittels EDC 19 und DMAP 20	40
Schema 5-11: Entschützung des C-Terminus der TOTAPOL-funktionalisierten Fmoc-Aminosäure 32	41
Schema 5-12: Darstellung des Edukts und Produkts der TOTAPOL-Funktionalisierung der C-terminal geschützten Fmoc-Glutaminsäure 31 , um die TOTAPOL-funktionalisierte und Boc-geschützte Fmoc-Glutaminsäure 33 zu erhalten.	42
Schema 5-13: Allgemeine Darstellung der Synthese einer Benzophenon funktionalisierten Fmoc-Aminosäure. Dargestellt sind die Reaktionsschritte der Funktionalisierung der Seitenkette mit Benzophenon und die C-terminale Entschützung.	43
Schema 5-14: Darstellung der Benzophenon-Funktionalisierung der Carboxy-Seitenkette der C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure 31 mit 3-Amino-Benzophenon 34 mittels EDC 19 und DMAP 20	43
Schema 5-15: Entschützung des C-Terminus der Benzophenon funktionalisierten Fmoc-Aminosäure 35 zum markierten Produkt 36	44
Schema 5-16: Darstellung der Benzophenon-Funktionalisierung der Carboxy-Seitenkette der C-terminal geschützten Fmoc-Aminosäure 31 zum markierten Produkt 36	45
Schema 7-1: Synthese des Dispiro-Radikals 47 . a) Tetrahydro-4 <i>H</i> -pyran-4-on 53 , NH ₄ Cl, DMSO(abs.), 60 °C; b) H ₂ O ₂ , Na ₂ WO ₄ , Ethanol, RT; c) NaBH ₃ CN, Ammoniumacetat.	66

Schema 8-1: Darstellung der zyklischen Struktur und der "K"GD-Aminosäuresequenz ("Lys"-Gly-Asp, in blau) von Eptifibatid 54 sowie Einführung der Bissulfon-basierten Markierung in die reduzierte Disulfidbindung, um das markierte Eptifibatid zu erhalten. Hier wird die übliche Nomenklatur des Bindungsmotivs verwendet, obwohl es statt KGD homoRGD lauten sollte.[Herr, 2021 #492] ²¹²⁻²¹³	67
Schema 8-2: Darstellung der Synthese der Interkalator-Mischung von 57 und 58 bzw. 59 und 60 . a) Paraformaldehyd, Dimethylamin Hydrochlorid, Isopropanol, Reflux, 24 h; b) 4-Methylthiophenol, Isopropanol/H ₂ O, RT, 24 h; c) H ₂ O ₂ , AcOH, 30 °C, 24 h; d) EDC·HCl, HOBT, CH ₂ Cl ₂ / <i>N</i> -Methylmorpholin, 0 °C, 0,5 h; e) 4-Amino-TEMPO, CH ₂ Cl ₂ / <i>N</i> -Methylmorpholin, 0 °C, 24 h, f) Propargylamin, CH ₂ Cl ₂ / <i>N</i> -Methylmorpholin, 0 °C, 24 h.[Herr, 2021 #492]	68
Schema 8-3: Darstellung der Interkalationsreaktion der Bissulfon-basierten Radikal-Markierung 57 in die Disulfidbindung von Eptifibatid 54 . a) Dithiothreitol 63 , MeCN:H ₂ O 1:1 (v/v), RT, 20 h; b) MeCN:H ₂ O 1:1 (v/v), pH = 7,8 (NaH ₂ PO ₄), RT, 24 h; c) MeCN:H ₂ O 1:1 (v/v), pH = 7,8 (NaH ₂ PO ₄), RT, 24 h.[Herr, 2021 #492]	69
Schema 8-4: Reduktionsreaktion von Ellmans-Reagenz 64 (DTNB,) mit Dithiothreitol 63 (DTT) zum Mischdisulfid 65 und 2-Nitro-5-thiobenzoessäure 66 (TNB).[Herr, 2021 #492]	71
Schema 8-5: Darstellung der Interkalationsreaktion der Bissulfon-basierten PHIP-Markierung 59 in die Disulfidbindung von Eptifibatid 54 . a) Dithiothreitol 63 , MeCN:H ₂ O 1:1 (v/v), RT, 20 h; b) MeCN:H ₂ O 1:1 (v/v), pH = 7.8 (NaH ₂ PO ₄), RT, 24 h; c) MeCN:H ₂ O 1:1 (v/v), pH = 7.8 (NaH ₂ PO ₄), RT, 24 h.....	75



Erklärungen

§8 Abs. 1 lit. c Promotionsordnung

Ich versichere hiermit, dass die elektronische Version meiner Dissertation mit der schriftlichen Version übereinstimmt und für die Durchführung des Promotionsverfahrens vorliegt

§8 Abs. 1 lit. d Promotionsordnung

Ich versichere hiermit, dass zu einem vorigen Zeitpunkt noch keine Promotion versucht wurde und zu keinem früheren Zeitpunkt an einer in- oder ausländischen Hochschule eingereicht wurde.

§9 Abs. 1 Promotionsordnung

Ich versichere hiermit, dass die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen verfasst wurde.

§9 Abs. 2 Promotionsordnung

Die Arbeit hat bisher noch nicht zu Prüfungszwecken gedient.

Darmstadt, den 13.07.2021

(Kevin Sebastian Herr)